

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARLA DANIELLE MORETTO

IMPACTO DO CONSUMO BALANCEADO DE AGPI ω 6 e AGPI ω 3 SOBRE AS
FUNÇÕES DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO EM RESPOSTA À
INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA EM RATOS.

CURITIBA

2012

KARLA DANIELLE MORETTO

IMPACTO DO CONSUMO BALANCEADO DE AGPI ω 6 e AGPI ω 3 SOBRE AS
FUNÇÕES DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO EM RESPOSTA À
INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA EM RATOS.

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular- Área de Concentração Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Moretto, Karla Danielle

Impacto do consumo balanceado de AGPI $\omega 6$ e AGPI $\omega 3$ sobre as funções de células do sistema imune inato em resposta à indução de endotoxemia em ratos. / Karla Danielle Moretto. – Curitiba, 2012.
105 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Ácidos graxos 2. Óleo de peixe 3. Endotoxemia I. Título II. Fernandes, Luiz Cláudio III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 612.01577

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. José Luiz de Andrade Neto
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Sandro José Ribeiro Bonatto
Instituto Pelé – Pequeno Príncipe

Após argüir a mestranda **Karla Danielle Moretto**, em relação ao seu trabalho intitulado: "IMPACTO DO CONSUMO BALANCEADO DE AGPI $\omega 6$ e AGPI $\omega 3$ SOBRE AS FUNÇÕES DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO EM RESPOSTA À INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA EM RATOS", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de janeiro de 2012

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Carlos e Edna,
ao meu marido, Adriano,
à minha linda filha, Alícia.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Edna, por todo amor e apoio dedicados a mim e por terem sempre valorizado o estudo em minha educação.

Ao meu marido, Adriano, pelas palavras de conforto sempre que precisei e por me proporcionar, juntamente com nossa filha, Alícia, felicidade diariamente.

Ao meu sogro, Zoca, e minha sogra, Vera, por cuidarem tão bem de mim e de minha família e por possibilitarem a conclusão do curso de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Luiz Cláudio, pelas observações perspicazes.

À Equipe do Laboratório de Metabolismo Celular pelo auxílio técnico, em especial Júlia, Dalva, Sandro e Katya pelo apoio nos momentos difíceis.

Às minhas estagiárias, Vanessa e Débora, pelo comprometimento e dedicação com que me ajudaram.

À Prof. Anita Nishiyama, pelo incentivo e co-orientação.

Ao Prof. Edvaldo da Silva Trindade, pela ajuda disponibilizada.

Às Equipes dos Biotérios da UFPR e da PUC-Pr, pelos ensinamentos.

À empresa HERBARIUM Laboratório Botânico, situada em Colombo- Pr, pelo auxílio à pesquisa através da doação das cápsulas de óleo de peixe.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A razão entre ácidos graxos polinsaturados (AGPI) $\omega 6$ e $\omega 3$ na era paleolítica era 1:1 e hoje nos países ocidentais é de 15 a 25:1, a qual está associada a maior prevalência de doenças caracterizadas por inflamação. AGPI $\omega 3$ são capazes de atenuar a resposta inflamatória. A sepse tem diagnóstico prevalente em todo mundo e é caracterizada por morbi- mortalidade importante e custos hospitalares elevados. **OBJETIVO:** Este estudo objetivou investigar o impacto do consumo balanceado de diferentes razões AGPI $\omega 6:\omega 3$ sobre as funções de células do sistema imunitário inato, particularmente neutrófilos e macrófagos, envolvidas na resposta à indução de endotoxemia bacteriana, modelo experimental de sepse utilizado. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizados 60 ratos Wistar e a eles fornecidas dieta padrão (C) e suplementações com óleo de peixe (N3), óleo de girassol (N6) e nas razões $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 (R7) e 14:1 (R14) por 04 semanas. Ao final deste período foi inoculado 10 mg/kg de Lipopolissacarídeo intraperitoneal (LPS) em metade dos ratos, obtendo-se os seguintes subgrupos: CLPS, R7LPS, R14LPS, N3LPS, N6LPS com seus respectivos controles não estimulados. Após 03 horas da indução da endotoxemia, realizou-se a ortotanásia dos animais por decapitação para coleta de macrófagos a partir do lavado peritoneal e de neutrófilos do sangue para realização dos ensaios referentes à fagocitose, captação de vermelho neutro (volume lisossomal), produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A estatística empregada foi análise de duas vias com pós-teste de Bonferroni com nível de significância para $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Os ratos submetidos à endotoxemia apresentaram-se prostrados e com eriçamento de pêlos. Na ausência de estímulo (basal), os macrófagos peritoneais de todos os grupos suplementados com AGPI, apresentaram aumento da fagocitose em relação ao controle (R7, R14, N3, N6 vs C). Houve menor captação de vermelho neutro pelas células do grupo R14 em relação a R7, N3 e N6 e ausência de alteração na produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais em relação ao controle (R7, R14, N3, N6 vs C). Após estímulo com LPS, não houve diferença na fagocitose entre os grupos R7LPS, R14LPS e N3LPS quando comparados ao basal (R7, N3 e N6). O volume lisossomal aumentou em todos os grupos estimulados em relação ao basal (CLPS, R7LPS, R14LPS, N3LPS, N6LPS vs C, R7, R14, N3, N6 respectivamente) e a produção de ânion superóxido foi similar à do basal (R7 e N3) nos grupos R7LPS e N3LPS em resposta à endotoxemia. Quanto aos neutrófilos sanguíneos, no basal houve aumento da fagocitose em todos os grupos suplementados com AGPI com elevação da captação de vermelho neutro no grupo N6 e incrementos na produção de ânion superóxido nos grupos R14, N3 e N6 e de peróxido de hidrogênio nos grupos R7, R14 e N6 se comparados ao controle (C). Após estímulo com LPS, foi verificada a ausência de incremento à atividade fagocitária nos grupos N3LPS e R7 LPS em relação ao basal (N3 e R7, respectivamente) e aumento do volume lisossomal nos grupos CLPS, R7LPS, R14LPS e N3LPS vs. basal (C, R7, R14 e N3 respectivamente). Quanto à produção de espécies reativas de oxigênio, neutrófilos dos grupos R7LPS, R14 LPS e N3LPS não apresentaram aumento de ânion superóxido se comparados ao basal (R7, R14 e N3 respectivamente), sendo a produção significativamente maior no grupo R14LPS se comparado aos grupos R7LPS e N3 LPS. A secreção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos sanguíneos dos grupos R14LPS, N3LPS e N6LPS aumentou se comparada ao basal (R14, N3 e N6 respectivamente), porém as elevações verificadas nos grupos R14LPS e N6LPS

foram significativamente maiores que as respostas observadas nos grupos CLPS, R7LPS e N3LPS. **CONCLUSÃO:** Os resultados apresentados sugerem que as suplementações alimentares com óleo de peixe ou na razão $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 foram capazes de atenuar a resposta inflamatória inicialmente induzida na presença de endotoxemia bacteriana ao atuar sobre os parâmetros imunitários de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos analisados neste estudo.

Palavras-chave: Ácidos Graxos Poliinsaturados; Óleo de peixe; Seps; Endotoxemia; Lipopolissacáride; Neutrófilos; Macrófagos; Inflamação.

SUMMARY:

BACKGROUND: The ratio between polyunsaturated fatty acids (PUFA) $\omega 6$ and $\omega 3$ in the Paleolithic era was 1:1 and today is about 15-25:1 in Western countries, which has been associated with highest prevalence of diseases characterized by inflammation. PUFA $\omega 3$ are able to reduce inflammatory responses. Sepsis is a prevalent diagnosis worldwide and is characterized by morbidity and mortality and higher hospital costs. **AIM:** This work aimed to investigate the impact of different ratio of $\omega 6:\omega 3$ PUFA on innate immune cells, particularly macrophages and neutrophils, involved in the response to endotoxemia, sepsis model used in this study. **METHODS:** Sixty Wistar rats were fed with a standard diet (C) and supplemented with sunflower (N6), fish oil (N3) and ratio $\omega 6:\omega 3$ PUFA of 7:1 (R7) and 14:1 (R14) for four weeks. Following, 10 mg/kg LPS were inoculated intraperitoneally in half of the groups, named as: CLPS, R7LPS, R14LPS, N3LPS, N6LPS. Three hours after induction of endotoxemia, the animals were decapitated and the peritoneal macrophages and blood neutrophils were harvested for assays related to phagocytosis, neutral red uptake (lysosomal volume), superoxide anion and hydrogen peroxide productions. Statistical analysis was performed by Two Way ANOVA with post hoc Bonferroni test with significance level of $p < 0,05$. **RESULTS:** Rats subjected to endotoxemia were prostrate and bristling hair. In the absence of stimulation (baseline), peritoneal macrophages from all PUFA supplemented groups showed increased phagocytosis compared to control groups (R7, R14, N3, N6 vs C). There was lower neutral red uptake by R14 macrophages in relation to R7, N3 and N6 groups. There were no changes in superoxide anion production between the groups. After LPS stimuly, there were no changes in R7LPS, R14LPS e N3LPS phagocytosis compared to baseline (R7, R14 and N3). Lysosomal volume increased in all PUFA stimulated groups compared to baseline (CLPS, R7LPS, R14LPS, N3LPS, N6LPS vs C, R7, R14, N3, N6 respectively) and anion superoxide production was similar to those seen at baseline (R7 and N3) in R7LPS e N3LPS groups respectively in response to endotoxemia induction. Regarding to blood neutrophils, at basal there was an increase in the phagocytosis in all AGPI supplemented groups compared to control (R7, R14, N3, N6 vs. C), augmented neutral red uptake in the N6 group, incremented superoxide production in R14, N3, N6 groups and hydrogen peroxide production in R7, R14 e N6 groups compared to control (C). After LPS stimuly, there was found no elevation in the phagocytosis in the R7LPS e N3LPS groups and augmented neutral red uptake by blood neutrophils in the CLPS, R7LPS, R14LPS e N3LPS vs. baseline. Oxygen reactive species production by neutrophils from R7LPS, R14LPS e N3LPS groups showed no increase in the superoxide anion generation compared to baseline, production of R14LPS and N6LPS groups being significantly greater than those seen in R7LPS e N3LPS groups. The hydrogen peroxide production from R14LPS, N3LPS, N6LPS blood neutrophils augmented compared to respective baseline (R14, N3 e N6), but the increase in the R14LPS e

N6LPS were significantly higher than those seen in the CLPS, R7LPS e N3LPS groups. **CONCLUSION:** Our data suggest that fish oil and the $\omega 6:\omega 3$ 7:1 ratio supplementation can mitigate the inflammatory response initially induced in the presence endotoxemia by acting on immune parameters analyzed in this study of peritoneal macrophages and blood neutrophils.

KEYWORDS: Polyunsaturated Fatty Acids; Fish Oil; Sepsis; Endotoxemia; Lipopolysaccharide; Neutrophils; Macrophages; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Parede celular de bactérias GRAM negativas e estrutura molecular lipopolissacarídeo bacteriano.
- FIGURA 2-** Reconhecimento celular do lipopolissacarídeo bacteriano.
- FIGURA 3-** Síntese de derivados dos ácidos graxos essenciais LA ($\omega 6$) e ALA ($\omega 3$).
- FIGURA 4-** Esquema hipotético referente ao consumo de gordura, ácidos graxos e vitaminas E e C na nutrição humana.
- FIGURA 5-** Estrutura molecular de um glicerofosfolípídeo.
- FIGURA 6-** Produção de eicosanóides e docosanóides por AGPI $\omega 3$ e $\omega 6$.
- FIGURA 7-** Separação de células sanguíneas em Ficoll Histopaque.
- FIGURA 8-** Composição das dietas administradas.
- FIGURA 9-** Peso dos animais no início e após a administração das dietas.
- FIGURA 10-** Fagocitose de *zymosan* pelos macrófagos peritoneais.
- FIGURA 11-** Produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais.
- FIGURA 12-** Captação de vermelho neutro pelos macrófagos peritoneais.
- FIGURA 13-** Fagocitose de *zymosan* pelos neutrófilos sanguíneos.
- FIGURA 14-** Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos sanguíneos.
- FIGURA 15-** Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos sanguíneos.
- FIGURA 16-** Captação de vermelho neutro pelos neutrófilos sanguíneos.

LISTA DE SIGLAS

ACCP/SCCM	- <i>American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine.</i>
ALA	- Ácido α Linolênico.
ARA	- Ácido Araquidônico.
BPI	-Proteína de aumento da permeabilidade bacteriana/ bactericida.
bpm	- Batimento por minuto.
CARS	-Síndrome da Resposta Anti- inflamatória Compensatória.
CEEA	- Comitê de Ética em Experimentação animal.
COX	- Ciclooxygenase.
1,2 DAG	- 1,2 diacilglicerol.
DMOS	- Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos.
DHA	- Ácido Docosahexaenóico.
E. coli	- Eschericchia coli.
EPA	- Ácido Eicosapentaenóico.
EROS	- Espécies Reativas de Oxigênio.
ev	- Endovenoso.
fMLP	- <i>N-formyl methionyl leucyl phenylalanine.</i>
G-CSFR	- Receptor do fator estimulador de colônia de granulócitos.
GLA	- Ácido γ Linolênico.
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography.</i>
IAM	- Infarto Agudo do Miocárdio.
ICAM- 1	- Molécula de adesão intercelular -1.

<i>IFNγ</i>	- Interferon γ .
<i>IFNβ</i>	- Interferon β .
<i>IκB</i>	- Proteínas inibitórias κ B.
<i>IκK</i>	- Complexo I κ B quinase.
<i>IL1β</i>	- Interleucina 1 β .
<i>IL2</i>	- Interleucina 2.
<i>IL4</i>	- Interleucina 4.
<i>IL6</i>	- Interleucina 6.
<i>IL8</i>	- Interleucina 8.
<i>IL10</i>	- Interleucina 10.
<i>IL12</i>	- Interleucina 12.
<i>IL13</i>	- Interleucina 13.
<i>IL1RA</i>	- Antagonista do receptor de IL1.
<i>Ins[1,4,5]P₃</i>	- 1,4,5 inositol trifosfato.
<i>ip</i>	- Intraperitoneal.
<i>ipm</i>	- Incursões por minuto.
<i>IRF3</i>	- Fator transcricional <i>IFN- regulatory factor</i> .
<i>IRAK</i>	- <i>IL-1-receptor associated kinase</i> .
<i>LA</i>	- Ácido Linoleico.
<i>LBP</i>	- Proteína ligadora de lipopolissacarídeo.
<i>LOX</i>	- Lipooxigenase.
<i>LPS</i>	- Lipopolissacarídeo.
<i>LT</i>	- Leucotrieno.

<i>LTB4</i>	- Leucotrieno B4.
<i>MHC</i>	- <i>Major Histocompatibility Complex.</i>
<i>MIP-2</i>	- Fator inibidor de macrófagos 2.
<i>MnSOD</i>	- Superóxido Dismutase ligada a manganês.
<i>MAPK</i>	- Mitogen- activated protein kinase.
<i>MSR</i>	- <i>Macrophage scavenger receptor.</i>
<i>MYD88</i>	- <i>Myeloid differentiation protein 88.</i>
<i>NADPH oxidase</i>	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido oxidase.
<i>NETs</i>	- <i>Neutrophil Extracellular Traps.</i>
<i>NFκB</i>	- <i>Nuclear factor κB.</i>
<i>NK</i>	- <i>Natural killer.</i>
<i>NOD</i>	- <i>Nucleotide-binding oligomerization domain.</i>
<i>NOS</i>	- Óxido nítrico sintase.
<i>PAF</i>	- Fator ativador de plaquetas.
<i>PAMP</i>	- Padrões moleculares associados a patógenos.
<i>PKC</i>	- Proteína quinase C.
<i>PMA</i>	- <i>Phorbol Myrystate Acetate.</i>
<i>PPAR</i>	- <i>Peroxisomal proliferator activators.</i>
<i>PRR</i>	- Receptores de reconhecimento de padrões.
<i>SIRS</i>	- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica.
<i>SOD</i>	- Superóxido Dismutase.
<i>TAP</i>	- Tempo de pró- trombina.
<i>TBX</i>	- Tromboxana.

TCM	- Triglicerídeos de cadeia média.
TGFβ	- Fator de crescimento transformador β.
TIR	- <i>TLR/IL-1 receptor homology domain.</i>
TIRAP/MAL	- <i>TIR domain-containing adapter protein.</i>
TOLLIP	- <i>Toll- interacting protein.</i>
TLR	- <i>Toll like Receptor.</i>
TNF α	- <i>Fator de Necrose Tumoral α.</i>
TRAF6	- <i>Tumour necrosis factor- receptor- associated- factor 6</i>
T_{regs}	- Células T regulatórias.
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva.
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular-1.
ZnCuSOD	- Superóxido Dismutase ligada a zinco e cobre.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	SEPSE: DEFINIÇÃO DE EPIDEMIOLOGIA.....	19
	2.1.1 Definição.....	19
	2.1.2 Epidemiologia.....	20
2.2	ENDOTOXINA BACTERIANA.....	24
2.3	A PRIMEIRA LINHA DE DEFESA DO ORGANISMO.....	29
	2.3.1 Papel dos macrófagos na resposta imunitária inata.....	29
	2.3.2 Papel dos neutrófilos na resposta imunitária inata.....	32
2.4	A SEPSE E SUA RELAÇÃO COM MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS....	35
2.5	OS ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ω3 E A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	40
3	OBJETIVO.....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
4.2	OBTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	51
	4.2.1 Obtenção de neutrófilos a partir do sangue periférico.....	51
	4.2.2 Obtenção de macrófagos a partir do lavado peritoneal.....	52
4.3	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS.....	52
	4.3.1 Produção de peróxido de hidrogênio.....	53
	4.3.2 Produção de ânion superóxido.....	53
	4.3.3 Retenção de vermelho neutro.....	53
	4.3.4 Atividade fagocitária.....	54
4.4	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS RAÇÕES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	54
	4.4.1 Extração lipídica de alíquotas das rações preparadas.....	55
	4.4.2 Saponificação dos extratos lipídicos obtidos.....	55
	4.4.3 Derivatização dos ácidos graxos.....	55
	4.4.4 Obtenção dos cromatogramas por HPLC.....	56
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56

5	RESULTADOS.....	57
5.1	Composição das dietas administradas.....	57
5.2	Peso dos animais no início e após a administração das dietas administradas.....	58
5.3	Fagocitose por macrófagos peritoneais.....	59
5.4	Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais.....	60
5.5	Retenção de vermelho neutro por macrófagos peritoneais.....	61
5.6	Fagocitose por neutrófilos sanguíneos.....	62
5.7	Produção de ânion superóxido por neutrófilos sanguíneos.....	63
5.8	Produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos sanguíneos.....	64
5.9	Retenção de vermelho neutro por neutrófilos sanguíneos.....	65
6	DISCUSSÃO.....	66
6.1	Considerações sobre o delineamento experimental.....	66
6.2	Efeitos das diferentes suplementações alimentares sobre os parâmetros imunitários de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais obtidos de ratos não estimulados com LPS (Grupos C, R7, R14, N3, N6).....	67
	6.2.1 Fagocitose e Retenção de vermelho neutro.....	67
	6.2.2 Produção de Peróxido de Hidrogênio e Ânion Superóxido.....	71
6.3	Respostas à endotoxemia de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos alimentados com dieta padrão (Grupos C e CLPS.....	74
6.4	Respostas à endotoxemia de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos, sua relação com o basal e com as diferentes suplementações ofertadas aos ratos.....	76
7	CONCLUSÃO.....	86
8	BIBLIOGRAFIA.....	87

1 INTRODUÇÃO:

A sepse, a qual é definida pela presença do diagnóstico da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) associada à presença de um foco infeccioso identificado (BONE *et al*, 1992), possui taxas de incidência e prevalência elevadas e consiste em importante causa de morbi-mortalidade em todo mundo (ANGUS *et al*, 2001; HALL *et al*, 2011; VINCENT *et al*, 2006; SILVA *et al*, 2004; SALES JÚNIOR *et al*, 2006; VINCENT *et al*, 2009).

Entre os principais agentes etiológicos desta patologia estão as bactérias Gram- negativas (COHEN, 2002), sendo estas portadoras de endotoxina denominada lipopolissacarídeo (LPS), a qual se encontra ancorada ao folheto externo da membrana celular externa das bactérias citadas (JEAN- BAPTISTE, 2007). Tal endotoxina é capaz de ativar o sistema imunitário inato por mecanismos variados (COHEN, 2002), sendo o principal aquele relacionado à interação do LPS com o receptor *Toll like receptor 4* (TLR4) presente na membrana de vários tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células epiteliais intestinais e pulmonares, células endoteliais, células dendríticas e linfócitos B e T (IMLER *et al*, 2001).

Fazem parte do sistema imunitário inato os macrófagos e os neutrófilos. Após invasão de um ambiente estéril por um microorganismo, este é inicialmente reconhecido pelos macrófagos residentes teciduais, os quais se tornam ativados visando a erradicação do patógeno. Na impossibilidade de controle da infecção, a amplificação do sinal inflamatório pelas células ativadas promove o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão.

Tanto macrófagos como neutrófilos iniciam o combate ao microorganismo pelo processo de fagocitose, o qual consiste na endocitose da partícula a ser ingerida e posterior destruição da mesma (CALDER, 2001). Para isso, o fagossomo formado após a endocitose da partícula se funde com o lisossomo e este libera seu conteúdo no interior do agora fagolisossomo, o que resulta em acidificação do meio e, juntamente com a ação de peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, culmina na morte do microorganismo ingerido (JANEWAY *et al*, 2006).

A resposta inflamatória na sepse é variável entre os indivíduos. Pode ocorrer desde inflamação maciça a estado imunossupressor designados pelos termos

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS), respectivamente (BONE, 1996). Ambos podem ocasionar a Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (DMOS), cujo diagnóstico é realizado com a detecção de disfunção orgânica em um doente crítico (BONE *et al*, 1992).

A possibilidade de ocorrência de DMOS secundária à hiperinflamação associada à sepse torna atraente o estudo da influência dos AGPI $\omega 3$, disponíveis comercialmente em cápsulas de óleo de peixe, sobre esta doença, já que tais ácidos graxos são importantes para a atenuação da resposta inflamatória (CALDER, 2001; GALLI e CALDER, 2009; GOGUS e SMITH, 2010).

Atualmente a dieta ocidental é deficiente em AGPI $\omega 3$ e a razão entre AGPI $\omega 6:\omega 3$ encontra-se em torno de 15-25:1 (SIMOPOULOS, 1999a), enquanto na era Paleolítica se aproximava de 2-1:1 (EATON e KONNER, 1985). O menor consumo de AGPI $\omega 3$ associa-se à maior prevalência de doenças crônicas caracterizadas por inflamação, como aterosclerose, hipertensão essencial, diabetes, obesidade e neoplasias (SIMOPOULOS, 1999 a,b).

Os AGPI $\omega 3$ são substratos à síntese de fosfolípídeos constituintes das membranas celulares e, desse modo, podem influenciar a fluidez das mesmas (McMURCHIE, 1988) e alterar a composição dos *lipid rafts*, regiões especializadas da membrana que contém proteínas ligadas à sinalização celular (CALDER e YAQOOB, 2007). Além disso, atuam como precursores de eicosanóides menos potentes que os derivados dos AGPI $\omega 6$ (SIMOPOULOS, 1999a; CALDER, 2001; GOGUS e SMITH, 2010), inibem a ativação do fator transcricional NF κ B (STULNIG *et al*, 2001; MISHRA *et al*, 2004) e promovem o aumento da atividade dos fatores transcricionais *peroxissomal proliferator activators* (PPARs) (MISHRA *et al*, 2004; CALDER, 2003).

Considerando a alteração no comportamento alimentar da população mundial, em especial da ocidental, no que diz respeito ao consumo de AGPI $\omega 3$ e a elevada morbi- mortalidade ocasionada pela sepse, estudos referentes à evolução deste quadro no que concerne ao sistema imunitário quando da presença de AGPI $\omega 3$ são importantes. Até o momento parece não haver nenhum estudo que tenha investigado o efeito de alteração da razão $\omega 6:\omega 3$ para próxima da recomendada

sobre a resposta imunitária de neutrófilos e macrófagos em animais submetidos à indução da endotoxemia, modelo experimental de sepse empregado neste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA:

2.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

2.1.1 DEFINIÇÃO:

Em agosto de 1991, *The American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) propuseram definições a serem aplicadas a pacientes com diagnóstico de sepse devido à necessidade de padronização dos termos utilizados para essa patologia em pesquisas científicas. Desse modo, foram propostos os termos:

1) Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)- processo inflamatório decorrente de insultos variados. O diagnóstico pode ser dado na presença de duas ou mais das seguintes manifestações clínicas:

- a) Temperatura corpórea- febre (temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia (temperatura $< 36^{\circ}\text{C}$).
- b) Taquicardia- frequência cardíaca > 90 bpm.
- c) Taquipnéia- frequência respiratória > 20 ipm ou hiperventilação ($\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$).
- d) Leucocitose (leucócitos > 12000 cels/ mm^3 ou < 4000 cels/ mm^3 ou presença de $>10\%$ de neutrófilos imaturos (bastões).

Tais alterações devem representar uma alteração aguda na ausência de outras causas conhecidas para tais anormalidades.

2) Sepse- SIRS desencadeada por processo infeccioso confirmado.

3) Sepse grave – sepse associada a disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão relacionada (Pressão Arterial Sistólica < 90 mmHg ou queda de mais de

40 mmHg em relação ao basal na ausência de outras causas de hipotensão). A hipoperfusão pode ser caracterizada por acidose láctica, oligúria ou alterações agudas do estado mental.

4) Choque séptico - sepse grave na presença de hipotensão não responsiva à ressuscitação volêmica (BONE *et al*, 1992)

Os critérios propostos receberam críticas pois, apesar de serem muito sensíveis, não discriminam os pacientes com maior probabilidade de evolução para falência múltipla de órgãos. Entretanto, até o momento são muito úteis na prática clínica já que são consistentes com a hipótese de que a progressão clínica de SIRS a choque séptico define a história natural da resposta inflamatória secundária à infecção e confere maior taxa de mortalidade para pacientes com má perfusão tecidual e falência orgânica consequente (SILVA e BITTENCOURT, 2004).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Os estudos epidemiológicos demonstram a importância do desenvolvimento e aprimoramento de condutas preventivas e terapêuticas relacionadas à sepse dada a morbi- mortalidade importante ocasionada por esta patologia. Independentemente do nível de desenvolvimento do país, a sepse possui taxas de prevalência, incidência e mortalidade elevadas.

ANGUS *et al* (2001) em estudo retrospectivo para a análise da epidemiologia da sepse severa nos Estados Unidos consideraram dados hospitalares do ano de 1995 de sete estados americanos, resultando em 192.980 casos de sepse severa. A importância deste estudo reside na inclusão de crianças (exceto as menores de um ano) e adultos e na correlação realizada entre os dados hospitalares obtidos e o censo americano do mesmo ano. Com isso, concluiu-se, após ajustes para idade e sexo, que a incidência anual de sepse grave é de 3 casos por 1000 habitantes chegando a uma estimativa de 751000 casos/ano. A mortalidade hospitalar geral foi de 28,6%, o que representaria 215000 mortes no país/ano. O custo resultante em média foi de 22.100 dólares/caso, sendo este aumentado nos casos de não-

sobreviventes, tratamento em UTI, pacientes cirúrgicos e conforme a quantidade de órgãos disfuncionantes, sendo maior quanto maior o número de disfunções.

Relatório epidemiológico americano publicado em 2011 pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* com base em dados coletados entre os anos de 2000 e 2008 refere que o número de hospitalizações por diagnóstico primário de sepse aumentou de 11,6 em 2000 para 22,1 por 10000 pessoas em 2008, enquanto hospitalizações por outras causas não aumentaram neste período. Se considerados os pacientes com diagnóstico primário juntamente com os internados por outro diagnóstico, mas que possuíam sepse e aqueles que desenvolveram sepse durante a internação, as hospitalizações aumentaram 70 % de 2000 a 2008. Constatou-se que os pacientes tinham quadros clínicos mais graves e tempos de internação 75 % mais longos que os internados por outras patologias. Além disso, demonstrou-se que os pacientes tinham risco de óbito 8 vezes maior que os internados por outras doenças. Em 2008 foi estimado um gasto anual de 14,6 bilhões de dólares em internações por sepse e, quando analisados os gastos desde 1997, os custos ajustados pela inflação relacionados às internações por sepse representaram um aumento de 11,9 % ao ano em média (HALL *et al*, 2011).

Na Europa, estudo prospectivo e multicêntrico intitulado “SOAP” contou com a inclusão de 3147 pacientes admitidos em unidades de Terapia Intensiva (UTI) entre 01 e 15 de maio de 2002. Destes, 37 % apresentavam infecção identificada, sendo o local mais comum de infecção os pulmões. A mortalidade referente à unidade de terapia intensiva foi de 27 % para pacientes com sepse e para aqueles com diagnóstico de sepse severa e choque séptico de 32,2% e 54,1% respectivamente. Tal estudo é importante pois não incluiu pacientes readmitidos nas UTIs, mesmo que com diagnóstico de sepse, tornando menor o risco de superestimativa das porcentagens apresentadas (VINCENT *et al*, 2006).

No Brasil, estudo multicêntrico prospectivo realizado em 5 UTIs de hospitais dos estados de São Paulo e Santa Catarina entre maio de 2001 e janeiro de 2002 contou com a inclusão de 1383 pacientes maiores de 18 anos admitidos em UTIs. Destes, 884 pacientes tiveram permanência em UTI maior que 24 horas, 46,9 % deles com critérios preenchidos para o diagnóstico de sepse. 27,3% apresentavam critérios para sepse grave e 23 % para choque séptico. A densidade de incidência

resultante para sepse, sepse grave e choque séptico foi de 61,4; 35,6 e 30,0 por 1000 pacientes/dia, respectivamente. As taxas de mortalidade foram de 33,9%, 46,9% e 52,2% para sepse, sepse grave e choque séptico respectivamente (SILVA *et al*, 2004).

Outro estudo brasileiro intitulado “Sepse Brasil” realizado de 1 a 30 de setembro de 2003 contou com a participação de 65 hospitais de todas as regiões do Brasil, incluindo no estudo 75 UTIs. Foram admitidos no período 3128 pacientes maiores que 18 anos. Na admissão, 16,7% dos pacientes apresentavam sepse. Durante o período, a sepse, sepse grave e choque séptico ocorreram em 19,6%, 29,6% e 50,8% casos respectivamente. A mortalidade global entre os sépticos foi de 46,6%. Nos subgrupos sepse, sepse severa e choque séptico, a mortalidade foi de 16,7%, 24,4% e 65,3% respectivamente (SALES JÚNIOR *et al*, 2006).

Mais recentemente, VINCENT *et al* (2009) em estudo intitulado “EPIC II” e realizado durante 24 horas em UTIs situadas nas Europas Ocidental e Oriental, Américas do Norte, Central e do Sul, Oceania, Ásia e África, recrutaram 13.796 pacientes maiores que 18 anos. Destes 51 % classificados como infectados, sendo o foco infeccioso mais comum novamente os pulmões. A mortalidade relacionada às UTIs foi de 18,2% no dia do estudo. Verificou-se que as taxas de infecção correlacionaram-se com o investimento financeiro empregado no cuidado à saúde. Taxas de infecção de 61,9% foram reportadas em países que investem menos de 5% do seu produto interno bruto em saúde; 53,8% em países que investem 5 a 9% e 48% naqueles que investem mais de 9%.

Como exposto, o diagnóstico de sepse é prevalente em todo mundo e é caracterizado por importante morbi- mortalidade e custos elevados. Além disso, é capaz de produzir impacto cognitivo e funcional a longo prazo nas pessoas acometidas pela enfermidade. IWASHYNA *et al* (2010) analisaram dados coletados quanto à função cognitiva e habilidade funcional de pessoas com 65 anos ou mais antes e depois de episódio de sepse severa de 1998 a 2005. Houve 1520 episódios de sepse severa entre 1194 pessoas. A mortalidade dentro de 90 dias após o episódio foi de 41,3% e em 05 anos de 81,9%. Verificaram declínio significativo na função cognitiva e nas habilidades funcionais independentemente do uso ou não de ventilação mecânica durante a internação e com o cuidado de realização de análises

de subgrupo que visaram excluir diagnósticos concomitantes que poderiam contribuir para os declínios cognitivo e funcional observados entre as entrevistas. Tais alterações são associadas ao aumento do tempo necessário para realização de cuidados pelo cuidador assim como maior quantidade de admissões hospitalares, depressão e mortalidade.

Quanto à epidemiologia dos microorganismos causadores, as bactérias Gram positivas e Gram negativas são os maiores agentes etiológicos, podendo também ocorrer infecções fúngicas, virais e mistas. No estudo EPIC II, 70 % dos pacientes infectados apresentavam culturas positivas, sendo 47% bactérias Gram positivas, 62 % bactérias Gram negativas e 19 % fungos. No estudo SOAP, as culturas se apresentaram positivas em 60 % casos, sendo 40 % destas bactérias Gram positivas, 38% bactérias Gram negativas, 17% fungos e 18 % infecções mistas. No estudo Sepsis Brasil, 40,1% dos episódios sépticos foram por bactérias Gram negativas, 32,8% por bactérias Gram positivas e 5% por fungos. Em comum a todos os estudos estão *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* como predominantes entre as bactérias Gram negativas e *Staphylococcus aureus* entre as Gram positivas.

2.2 ENDOTOXINA BACTERIANA: COMPONENTE ESTRUTURAL DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS.

A endotoxina é um importante componente estrutural do folheto externo da membrana celular externa de bactérias Gram negativas. Foi designada lipopolissacarídeo (LPS) devido à presença de componentes polissacarídicos e lipídicos, sendo considerada um produto livre de proteínas (BEUTLER e RIETSCHER, 2003).

A membrana celular externa das bactérias Gram negativas é constituída de uma bicamada lipídica separada da membrana celular interna por peptidoglicano (COHEN, 2002). No folheto externo da membrana celular externa, encontra-se ancorado o lipopolissacarídeo, cuja estrutura é característica e constituída por três partes:

- a) Antígeno Polissacarídeo O- cadeia situada na superfície externa da molécula da endotoxina com variação em sua configuração estrutural entre as bactérias Gram negativas.
- b) Lipídeo A- molécula situada na porção interna da endotoxina.
- c) Região Central- constituída por carboidrato e responsável pela ligação entre as porções interna e externa da endotoxina, ou seja, polissacarídeo O e lipídeo A (JEAN-BAPTISTE, 2007).

A região central e o lipídeo A possuem estrutura molecular mais conservada e conseqüente semelhança entre a maioria das bactérias Gram negativas (JEAN-BAPTISTE, 2007).

O lipídeo A é um glicofosfolipídeo que possui peso molecular de aproximadamente 1200kDa. Situa-se embebido no folheto externo da membrana celular da bactéria e ancora o lipopolissacarídeo à sua parede celular. É a molécula relacionada às propriedades tóxicas e pirogênicas da endotoxina. Sua atividade endotóxica não é dependente de um componente único de sua molécula, mas sim de uma conformação definida, já que alterações conformacionais de sua molécula resultam em menor poder endotóxico (HURLEY, 1995).

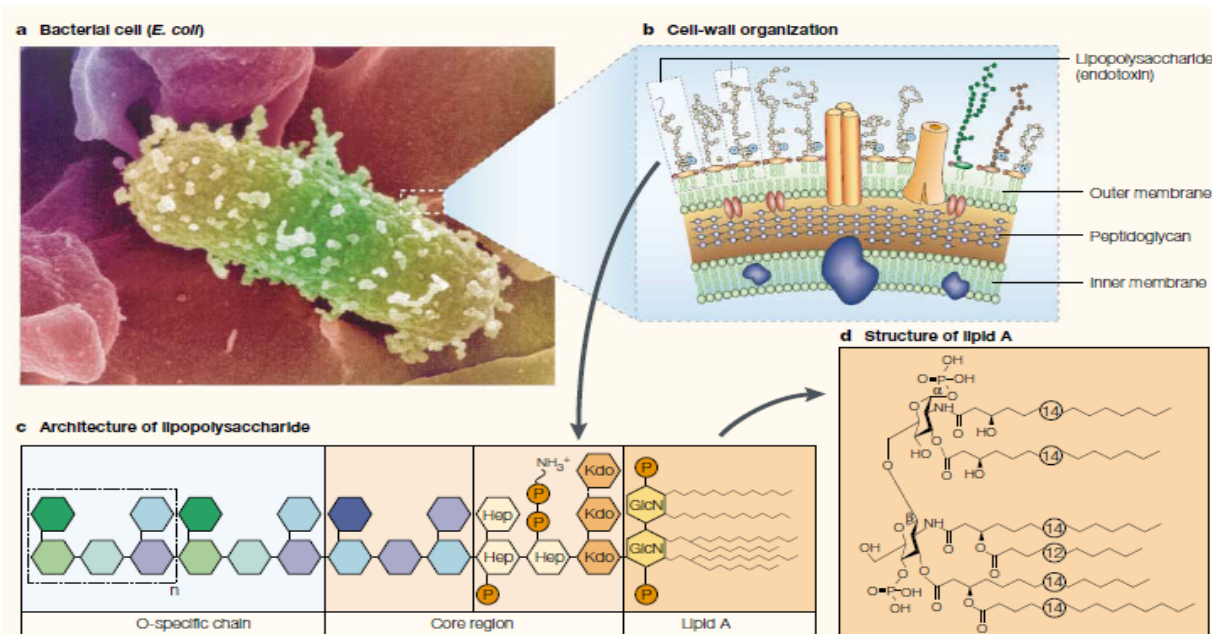


FIGURA 1: Parede celular de bactérias GRAM negativas e estrutura molecular lipopolissacarídeo bacteriano.

FONTE: BEUTLER E RIETSCHER, 2003.

Quanto ao mecanismo de ação do lipolissacarídeo, sua liberação em sítios infecciosos não é dependente da lise bacteriana, mesmo estando ele ancorado à parede celular. O processo pode ocorrer espontaneamente e ser acentuado por fatores ambientais, como o uso de antibióticos. Importante também é sua biodisponibilidade no sangue, já que existem proteínas produzidas pelo hospedeiro que funcionam como receptores para LPS capazes de modular sua atividade, como a proteína ligadora de LPS (LBP) e a proteína de aumento da permeabilidade bacteriana/bactericida (BPI).

A BPI é uma proteína produzida por leucócitos polimorfonucleares e armazenada em seus grânulos azurofílicos (TOBIAS *et al* 1997). Possui 45% de homologia quanto à sequência de aminoácidos se comparada à LBP e, em contraste com esta, sua ligação ao LPS resulta na inibição da bioatividade da endotoxina, contribuindo para a ação antibacteriana dos leucócitos polimorfonucleares. TOBIAS *et al* (1997) demonstraram que a BPI tem uma potente ação neutralizadora de LPS mesmo com a presença de LBP nos fluidos corporais, concluindo que possui afinidade mais elevada pelo LPS que a LBP.

A LBP é uma glicoproteína plasmática com peso molecular de 60 kDa sintetizada por hepatócitos. Em várias espécies, inclusive em humanos, é encontrada no soro normal em concentrações inferiores a 0,5 µg/ml, aumentando a 50 µg/ml 24 horas após a indução de uma reação de fase aguda (TOBIAS *et al* 1997). Possui um sítio de ligação para o lipídeo A, agindo como opsonina ao ligar-se à molécula de LPS e favorecer a interação deste com células do sistema imune inato, como macrófagos (SCHUMANN *et al* ,1990; TOBIAS *et al* ,1997). Desse modo, sua principal função parece ser aumentar a habilidade do organismo na detecção do LPS precocemente durante uma infecção (TOBIAS *et al* ,1997).

Uma vez formado o complexo LBP/LPS, a interação com células mononucleares depende da presença de um receptor denominado CD14. Este é uma glicoproteína com 55 kDa presente na membrana celular exclusivamente de monócitos e macrófagos (mCD14) ou solúvel no plasma (sCD14). WRIGHT *et al* (1990) constataram que o uso de anticorpos monoclonais contra CD14 inibe completamente a ligação do complexo LBP/LPS à superfície de macrófagos e que tal inibição foi responsável pela eliminação da produção de fator de necrose tumoral α (TNF α) por monócitos plasmáticos de coelhos na presença de LPS em concentrações que variavam de 0,01 a 1 ng/ml, demonstrando a importância do receptor CD14 para ativação dessas células. Células dendríticas, musculares lisas, endoteliais e fibroblastos, constitutivamente CD14 negativas, possuem a capacidade de interagir com o LPS através da interação com o receptor CD14 solúvel no plasma (COHEN, 2002; WRIGHT, 1990). Porém, o receptor CD14 não possui porção citoplasmática, propiciando questionamentos relacionados ao modo de ativação do sistema imune inato pelo LPS (COHEN, 2002).

Em 1996, foi realizada por HOFFMANN *et al* (1996) a descoberta de que o gene *TOLL* da *Drosophila*, responsável pelo estabelecimento do eixo dorsoventral do inseto, também estava envolvido na ativação do sistema imune inato contra infecções fúngicas. Após esta constatação, foram identificados homólogos do receptor *TOLL* em mamíferos, culminando na família *Toll-like Receptors* (TLRs). Os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana e membros da superfamília que inclui os receptores de interleucina-1 devido à importante homologia entre as regiões citoplasmáticas de ambos receptores. Posteriormente, após pesquisa genética com

camundongos, foi identificado por BEUTLER *et al* em 1998 a existência do receptor TLR4 em mamíferos, essencial para a interação do LPS com o sistema imune inato. A propósito, os cientistas Jules A. Hoffmann e Bruce Beutler foram os vencedores do Prêmio Nobel em Imunologia de 2011 juntamente com o cientista Ralph Steinman, que relatou a descoberta das células dendríticas.

Vários TLRs são expressos em células envolvidas na primeira linha de defesa do organismo, como macrófagos, neutrófilos, células epiteliais do trato gastrintestinal e dos pulmões, células endoteliais, células dendríticas e linfócitos B e T (IMLER *et al* 2001).

O reconhecimento do LPS é mediado por um complexo situado na membrana plasmática celular formado por três moléculas: CD14, TLR4 e MD2. A última consiste em molécula acessória necessária para a estabilização do TLR4 na membrana celular (IMLER *et al*, 2005). A sinalização intracelular depende da interação do *TLR/IL-1 receptor homology domain (TIR)* com a *IL-1-receptor associated kinase* (IRAK), o que é facilitado pela proteína adaptadora *myeloid differentiation protein 88* (MYD88). Após a ligação com IRAK, esta se desprende do complexo formado e ativa a *tumour necrosis factor- receptor- associated- factor 6* (TRAF6). Esta interação também pode ser inibida pela *Toll- interacting protein* (Tollip).

As vias de sinalização relacionadas a MYD88 e IRAK ativam o *nuclear factor κ B* (NF κ B) durante a resposta imune inata. A família dos fatores transcricionais NF κ B é composta de 05 membros: p65 (REL-A), REL-B, REL citoplasmática (cREL), p50 e p52. Tais fatores possuem importantes funções relacionadas à inflamação, proliferação e morte celulares. O NF κ B é mantido de forma latente no citoplasma celular através da ligação a proteínas inibitórias κ B (I κ B) e sua ativação depende da fosforilação e proteólise realizadas pelo complexo I κ B quinase (IKK), o qual é fosforilado pela TRAF6 e composto por 03 subunidades: IKK α , IKK β e a subunidade regulatória IKK γ , sendo que a ativação do NF κ B depende do IKK β e IKK γ , não do IKK α . Após a ativação, ocorre a translocação do NF κ B ao núcleo e transcrição de genes pró e anti- inflamatórios (AKIRA e TAKEDA, 2004; IMLER *et al*, 2001, CINEL e OPAL, 2009).

Existem outros mecanismos pelos quais ocorre a sensibilização ao LPS, os quais incluem o *macrophage scavenger receptor* (MSR), receptor CD11b/CD18, canais iônicos e receptores intracelulares denominados proteínas NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), sendo o mais estudado a via que inclui o TLR4 (COHEN, 2002; IMLER *et al*, 2001, AKIRA e TAKEDA, 2004).

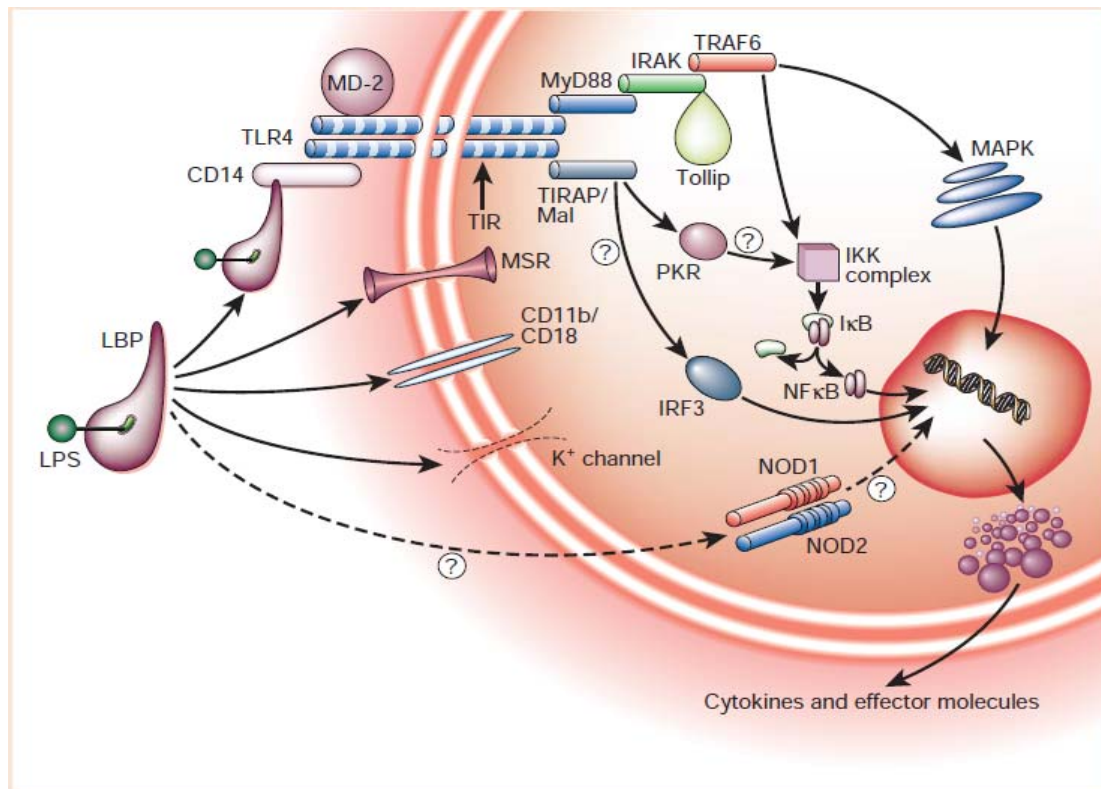


FIGURA 2: RECONHECIMENTO CELULAR DO LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO.

FONTE: COHEN 2002.

2.3 A PRIMEIRA LINHA DE DEFESA DO ORGANISMO: O SISTEMA IMUNITÁRIO INATO.

O sistema imunitário inato ou natural, caracterizado por resposta imediata à injúria, compreende a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos. É constituído por barreiras epiteliais, proteínas plasmáticas e células circulantes e teciduais, entre elas fagócitos mononucleares, neutrófilos e *células natural killer* (NK). Sua função é prevenir a entrada de microorganismos patogênicos e, caso adentrem o organismo, eliminá-los rapidamente. (CALDER, 2001; ABBAS *et al*, 2008)

Em vertebrados, a resposta imune inata é dependente de células mielóides, entre elas os fagócitos mononucleares e os polimorfonucleares. Os primeiros incluem os macrófagos e os últimos os neutrófilos, células de vida curta que sobrevivem por 06 horas na corrente sanguínea independentemente do encontro de microorganismos, sofrendo apoptose após esse período (BEUTLER, 2004).

2.3.1 PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA.

Os macrófagos são células derivadas de precursores mielóides que maturam na medula óssea até monócitos, os quais são então liberados na corrente sanguínea. Do sangue podem migrar para os tecidos em resposta à inflamação ou para constituir os macrófagos residentes presentes neles, como o que ocorre nos ossos (osteoclastos), alvéolos (macrófagos alveolares), sistema nervoso central (células microgliais), tecido conjuntivo (histiócitos), trato gastrointestinal, fígado (células de Kupffer), baço e peritônio (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Na dependência de suas capacidades e funções, constituem uma população heterogênea, demonstrando plasticidade importante frente ao estímulo encontrado. O processo de amadurecimento na medula óssea estabelece a presença de capacidades comuns a todas as populações de macrófagos, como expressão de receptores de superfície, possibilidade de secreção de lisozima e de síntese de

metabólitos do ácido araquidônico (ADAMS e HAMILTON, 1984). Dos macrófagos residentes aos ativados há incremento das funções celulares. Os macrófagos residentes são células consideradas quiescentes que possuem capacidade fagocítica e de quimiotaxia e são importantes na manutenção da homeostase do organismo ao promoverem a remoção de células que sofreram apoptose e de debris celulares decorrentes do remodelamento tecidual além de serem aptos a detectar sinais de perigo, promovendo a defesa do mesmo contra injúrias (MOSSER e EDWARDS, 2008; MURRAY e WYNN, 2011). Os macrófagos residentes teciduais podem ser ativados em resposta a variados estímulos inflamatórios e imunes. Porém, dependendo da magnitude do estímulo, a ativação dos macrófagos residentes teciduais pode não ser suficiente ao controle microbiano e reparo tecidual. Desse modo, ocorre a produção aumentada de precursores de granulócitos e células mononucleares na medula óssea. Os monócitos então produzidos migram da corrente sanguínea ao foco infeccioso e se diferenciam em macrófagos, que serão então ativados.

MOSSER e EDWARDS (2008) propuseram a classificação de macrófagos ativados em três populações baseando-se em suas funções: 1) macrófagos classicamente ativados; 2) macrófagos ligados à cicatrização de feridas; 3) macrófagos regulatórios. Elas podem ser ativadas tanto pelo sistema imune inato como pelo adquirido. A caracterização das células de cada população através de marcadores bioquímicos é difícil pois podem ocorrer macrófagos híbridos, os quais compartilham funções de diferentes populações, e o fenótipo celular pode se alterar durante o tempo de acordo com o estímulo a que a célula é exposta.

A caracterização inicial dos macrófagos classicamente ativados inclui a necessidade de combinação de dois sinais: o primeiro o *interferon* γ (IFN γ) e o segundo o TNF α . O IFN γ é inicialmente produzido por células NK em resposta a infecções e outros insultos, o que torna os macrófagos responsivos a um segundo sinal, que pode ser o TNF α ou um indutor da produção desta citocina, em geral agonistas dos TLRs. A interação com o segundo sinal promove a ativação clássica dos macrófagos, estimulando-os a produzirem maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio e citocinas pró- inflamatórias, como TNF α , *interleucina-6* (IL6), *interleucina 1 β* (IL1 β) e *interleucina 12* (IL12). A produção de

IFN γ pelas células NK é transitória e insuficiente para a manutenção da população de macrófagos ativados por tempo prolongado. Entretanto, as células agora ativadas expressam o *Complexo de Histocompatibilidade Maior II* (MHC II) e atuam como células apresentadoras de antígeno, proporcionando a ativação de linfócitos T *helper* do tipo Th1, os quais produzem INF γ , que juntamente com o TNF α produzido pelos macrófagos ativados, promove um mecanismo de retroalimentação positiva em relação à ativação macrofágica (CALDER, 2001; MOSSER e EDWARDS, 2008; GORDON, 2003; GALLI *et al* 2011). A ativação clássica também pode ocorrer diretamente através da interação de ligantes dos TLRs com o fator transcricional IFN- *regulatory factor* (IRF3), que promove a produção de interferon β (IFN β), o qual pode substituir o INF γ no processo de ativação celular (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Os macrófagos ativados relacionados à cicatrização de feridas são estimulados pelas *interleucinas 4* (IL4) e *13* (IL13), produzidas principalmente por mastócitos, basófilos e linfócitos T do tipo Th2 em resposta à lesão tecidual e infestação por parasitas. Esses macrófagos apresentam pequena capacidade de apresentação de antígenos, produzem pequena quantidade de citocinas pró-inflamatórias e têm menor potencial de eliminação de microorganismos patogênicos. Em contrapartida, produzem fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador β 1 (TGF β 1), citocina anti- inflamatória que estimula fibroblastos e células epiteliais na regeneração de tecidos, e promovem a conversão de arginina em ornitina, precursora de prolina, necessária para síntese do colágeno, e poliaminas, importantes para o crescimento e diferenciação celulares (MOSSER e EDWARDS, 2008; MURRAY e WYNN 2011; MOSSER, 2003).

A ativação clássica de macrófagos é importante para a defesa do organismo, porém suas funções devem ser controladas de modo a evitar lesões secundárias ao hospedeiro, tornando relevante a função dos macrófagos regulatórios. Vários são os mecanismos que influenciam na ativação destes macrófagos. Em resposta ao estresse, há a produção de glicocorticóide pelo eixo hipotálamo-hipófise- adrenal, o qual inibe a atividade antimicrobiana e inflamatória dos macrófagos sem diminuir a capacidade fagocítica relacionada à apoptose (MOSSER e EDWARDS, 2008). Após a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, há a produção de TGF β , que

além de participar de mecanismos de reparação tecidual, promove *down-regulation* de respostas Th1 e Th2, diminuição da produção de citocinas pró- inflamatórias por macrófagos ativados, inibição da transcrição gênica de interleucina 8 (IL8) e E-selectina por células endoteliais (PERL *et al*, 2006) e estímulo à células T regulatórias (T_{regs}) (CINEL e OPAL, 2009). A interação celular com imunocomplexos também pode estimular a diferenciação em macrófagos regulatórios. GERBER E MOSSER (2001), através de estímulo ao receptor Fcγ com LPS complexado à imunoglobulina G, observaram diminuição na produção de *interleucina 12* (IL12), que é pró- inflamatória, e aumento concomitante na concentração de *interleucina 10* (IL10) por macrófagos de camundongos. A relação aumentada entre IL10 e IL12 pode ser utilizada para definir os macrófagos regulatórios (MOSSER e EDWARDS, 2008). A IL10 é capaz de inibir respostas do tipo Th1 (PERL *et al*, 2006) e estimular linfócitos B e células T citotóxicas além de diminuir a produção de citocinas pró- inflamatórias e a expressão de MHCII por células mononucleares (van der POLL e van DEVENTER 1999). Desse modo, os macrófagos regulatórios possuem importante papel no controle das respostas tanto do sistema imunitário inato como do adaptativo.

2.3.2 PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA.

Os neutrófilos são células provenientes do processo de granulocitopoiese que ocorre na medula óssea. Seus precursores incluem o *mieloblasto*, *pró- mielócito*, *mielócito*, *metamielócito* e *bastonete*. Sua produção é realizada de modo constante em situações normais, sendo produzidas 1 a 2 x 10¹¹ células por dia em um indivíduo saudável. As células produzidas e seus precursores são mantidos na medula óssea através da interação do receptor CXCR4 com seu ligante CXCL12 presente nos osteoblastos e células endoteliais vasculares da medula óssea, formando um *pool* de células que podem ser liberadas na corrente sanguínea em caso de injúria. A liberação dos neutrófilos para a corrente sanguínea depende da interação de sinais com seus respectivos receptores, como TLRs, receptor do fator

estimulador de colônia de granulócitos (G-CSFR) e o receptor CXCR2 presente na superfície de células mielóides (BORREGAARD, 2010).

Em seres humanos, os neutrófilos constituem 50 a 70 % dos leucócitos circulantes (FUZISSAKI, 2009). Sua concentração na corrente sanguínea permanece praticamente constante em situações normais, podendo aumentar em 5 a 10 vezes na presença de infecção severa (BEUTLER, 2004). Possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como TLRs e proteínas NOD, tornando- os sensíveis ao reconhecimento de patógenos e sinais de dano tecidual, o que, juntamente com fatores quimiotáticos, promove a migração das células ao local da lesão e ativação de suas funções efectoras, tais como fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio, enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos, além da produção de citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos (MANTOVANI *et al*, 2011).

A migração dos neutrófilos ou diapedese ao local da lesão requer a interação com células endoteliais através da expressão de moléculas de adesão. Essa interação geralmente ocorre em vênulas pós- capilares já que a parede destas é mais fina e seu diâmetro pequeno, permitindo o contato das células com a parede vascular sem promover a oclusão da luz do vaso por elas (BOREGAARD, 2010). O processo requer etapas com relação temporal. A primeira delas é a marginação, em que os neutrófilos movem-se do centro à periferia do vaso. Em seguida segue-se o processo de rolamento, que requer a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. A presença de citocinas como TNF α e IL1 β estimula a expressão das moléculas de adesão *P- selectina* (presente em plaquetas e células endoteliais) e *E- selectina* (presente em células endoteliais). Tais moléculas interagem com a molécula de adesão *L- selectina*, expressa constitutivamente na superfície de neutrófilos. Para ocorrência da diapedese, deve haver fortalecimento da ligação entre as células, o que é favorecido pela expressão de *integrinas* na superfície dos neutrófilos e da *molécula de adesão intercelular -1* (ICAM-1) e *molécula de adesão celular vascular-1* (VCAM-1), ambas expressas na superfície das células endoteliais. Após adesão e na presença de um gradiente quimiotático proporcionado por citocinas como *interleucina 8* (IL8) e substâncias inflamatórias como *leucotrieno B4* (LTB₄), *fator ativador de plaquetas* (PAF) e

componente do complemento C5a, ocorre a migração dos neutrófilos ao local da lesão (BORREGAARD, 2011; ALVES- FILHO *et al*, 2010).

Assim que se estabelecem nos tecidos, os neutrófilos estimulam a migração de monócitos classicamente ativados ao local através de substâncias liberadas de seus grânulos que promovem o aumento da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio e de citocinas produzidas por eles e por células vicinais por eles estimuladas (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

Além dos mecanismos efetores clássicos, como produção de espécies reativas de oxigênio, peptídeos antimicrobianos e proteases, ocorre, como alternativa à morte por apoptose ou necrose, a formação das armadilhas neutrofílicas extracelulares (NETs- *Neutrophil Extracellular Traps*), que são estruturas formadas por componentes nucleares (DNA e histonas) e proteínas presentes nos grânulos celulares. Sua função consiste em promover a apreensão de microorganismos e facilitar a interação com as proteínas que o constituem e posterior destruição dos mesmos (MANTOVANI *et al*, 2011).

Os neutrófilos desempenham também uma importante função na resolução da inflamação de modo a evitar dano secundário ao hospedeiro. São capazes de inativar citocinas e produzir mediadores lipídicos, como *lipoxinas*, *resolvinas* e *protectinas*, capazes de diminuir a migração de neutrófilos e estimular sua apoptose, o que contribui para a liberação das proteínas *anexina 1* e *lactoferrina* (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010), que também inibem o processo migratório e estimulam a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, convertendo esses em macrófagos regulatórios (MANTOVANI *et al*, 2011; SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

2.4 A SEPSE E SUA RELAÇÃO COM MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS.

O mecanismo de resposta do hospedeiro à infecção envolve o reconhecimento celular pelo sistema imune inato de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o LPS, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), entre eles o TLR4 (CINEL e OPAL, 2009). Após o reconhecimento, o microorganismo pode ser eliminado por: 1) destruição direta pela ação de moléculas do complemento ou pela ação de radicais livres produzidos por células mononucleares ou proteínas tóxicas produzidas por células NK; 2) fagocitose do microorganismo invasor e posterior destruição do mesmo (CALDER, 2001).

JENNER e YOUNG (2005), mediante metanálise de 32 artigos relacionados ao padrão de transcrição gênica relacionado à infecção, revelaram a existência de uma resposta transcricional inicial comum às células do sistema imune inato, totalizando 511 genes em resposta a 77 patógenos, entre eles vírus, bactérias e fungos, sendo a intensidade de expressão dos mesmos variável de acordo com o tipo celular e patógeno envolvidos.

Após invasão de um ambiente estéril, o microorganismo é inicialmente reconhecido pelos macrófagos residentes teciduais. A resposta comum de macrófagos à infecção bacteriana compreende a transcrição de genes relacionados à ativação clássica dos macrófagos, entre eles aqueles referentes às citocinas TNF α , IL1 β , IL6, IL12, quimiocinas como IL8, enzimas como *óxido nítrico sintetase* (NOS) e moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86 (BENOIT et al, 2008), essas últimas são moléculas de superfície celular presentes nas células apresentadoras de antígeno, que na dependência da interação com receptores de superfície de linfócitos T podem estimular ou inibir a atividade e proliferação dessas células (STEARNS-KUROSAWA *et al* 2011).

Na impossibilidade de controle da infecção pelo macrófagos, a amplificação do sinal inflamatório pelas células ativadas promove o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão. As citocinas TNF α e a IL1 β estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (COHEN, 2002; BEUTLER, 2004; ALVES- FILHO *et al* 2010) e a quimiocina IL8 promove a formação de um gradiente de

concentração no foco infeccioso que favorece o estabelecimento de neutrófilos, visando a erradicação do patógeno (MANTOVANI *et al*, 2011).

O primeiro passo no combate ao microorganismo por macrófagos e neutrófilos constitui-se na fagocitose. Esta resulta de três etapas: 1) reconhecimento da partícula a ser ingerida por receptores celulares; 2) endocitose com formação do vacúolo fagocítico e; 3) destruição/degradação do material ingerido (CALDER, 2001). Após o reconhecimento celular e fagocitose do patógeno, ocorre fusão do fagossomo com o lisossomo com a liberação do conteúdo deste no interior do agora fagolisossomo, o que resulta em acidificação do meio e, juntamente com a ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e peptídeos antimicrobianos, culmina na morte do microorganismo ingerido, com posterior degradação do mesmo por hidrolases ácidas (JANEWAY, 2002).

As EROS necessárias à eliminação do patógeno são produzidas por uma série de reações iniciadas pela enzima *nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido oxidase* (NAPH oxidase), presente na membrana celular de células mononucleares e neutrófilos ativados. Tal enzima promove a formação de ânion superóxido a partir do oxigênio molecular, o qual é o substrato para a enzima *superóxido dismutase*, resultando na formação de peróxido de hidrogênio. A partir deste podem ser gerados halogenados reativos através da ação da *mieloperoxidase*, os quais são potentes agentes microbicidas. Entre eles estão o hipoclorito e o ácido hipocloroso, capazes de reagir com o ânion superóxido e formar o radical hidroxila, o qual também pode ser produzido independentemente do peróxido de hidrogênio e ânion superóxido através da reação de Fenton. O ânion superóxido também reage com o óxido nítrico, produzindo peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio. Tanto as espécies reativas de oxigênio como as de nitrogênio promovem a destruição dos microorganismos por reagirem com alvos moleculares como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos presentes nestes (BEUTLER, 2004).

Em situações fisiológicas há um balanço homeostático entre a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e sua remoção por compostos antioxidantes. O estresse oxidativo, que ocorre durante a sepse, decorre do desequilíbrio nesta relação seja por produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e/ou por defesas antioxidantes inadequadas. O estresse oxidativo pode

ocasionar dano às células do hospedeiro através de dano à membrana celular devido à peroxidação lipídica, oxidação do DNA e proteínas, despolarização da membrana mitocondrial resultando em prejuízos à respiração celular e dano mitocondrial, com liberação do citocromo c, ativação de caspases e apoptose celular. Além disso, o estado redox intracelular influencia na ativação do NFκB, já que antioxidantes inibem a ativação do NFκB, enquanto oxidantes estimulam, proporcionando manutenção de um estado pró- inflamatório (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Estudos indicam aumento da capacidade fagocítica e na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos e neutrófilos em casos de sepse e endotoxemia. VÍCTOR e LA FUENTE (2003) relataram aumento da aderência, capacidade fagocítica, produção de ânion superóxido e diminuição da quimiotaxia de macrófagos peritoneais de camundongos após exposição ao LPS intraperitoneal. MARTINS *et al* (2003) detectaram aumento da fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos coletados de pacientes sépticos. De fato em neutrófilos, a endotoxemia promove o acoplamento na membrana celular de componentes presentes no citoplasma e na própria membrana da enzima NADPH oxidase, estimulando sua ativação em resposta à fagocitose do microorganismo e posterior produção de espécies reativas de oxigênio (De LEO *et al* 1998).

Quando a infecção persiste a despeito da ação das células da imunidade inata, fragmentos de peptídeos dos microorganismos encontrados na superfície das células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas, promovem a ativação da resposta imune adaptativa, que é mediada por linfócitos B e T e é caracterizada por sua especificidade em relação aos antígenos e pela capacidade de determinar memória imunológica, de modo que quando o organismo é novamente exposto a determinado microorganismo, a resposta imune decorrente é mais rápida e potente do que a resposta inicial (CALDER 2001).

A sepse, definida como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) em presença de infecção comprovada, foi inicialmente considerada uma resposta inflamatória exacerbada e descontrolada, podendo ocasionar disfunção orgânica secundária ao hospedeiro (BONE *et al*, 1992; SILVA e OTHERO, 2004). Porém, a falência de estratégias visando o bloqueio de mediadores inflamatórios levou à

consideração de que o processo inflamatório nesta patologia é mais complexo. Como exposto anteriormente, a inflamação desencadeada pelas células do sistema imune inato seguem-se mecanismos de resolução da mesma, visando o restabelecimento da homeostase. Para que isso ocorra de modo eficiente é necessário equilíbrio entre os mediadores pró e anti- inflamatórios. BONE (1996) propôs o termo Síndrome da Resposta Anti- inflamatória Compensatória (CARS) para designar a imunossupressão ocasionada pelo desequilíbrio entre tais mediadores. Entre as substâncias envolvidas na CARS estão a IL10, os receptores solúveis de TNF α e os antagonistas do receptor de IL1 (IL1Ra) (JEAN- BAPTISTE, 2007). A IL10 é a principal contra- reguladora da resposta imune inata, diminuindo a expressão de moléculas MHCII e a produção de citocinas pró- inflamatórias por macrófagos, prejudicando a ativação da resposta imune adaptativa (OBERHOLZER, 2000).

Contribui para o estado imunossupressor que pode se desenvolver em pacientes sépticos a perda precoce de linfócitos T e B por apoptose, o que provoca a diminuição da produção de IFN γ , citocina importante para a ativação clássica de macrófagos (BEUTLER, 2004; WESCHE, 2005). E para o retardo à resolução da resposta inflamatória são fatores importantes a apoptose retardada de neutrófilos assim como falência na migração destas células ao foco infeccioso, a qual está relacionada à produção inicial excessiva de peroxinitrito em caso de sepse grave, prejudicando a adesão e rolamento de neutrófilos em contato com endotélio conforme demonstrado por DUENAS (2006) através do uso de inibidores de peroxinitrito, intervenção que acarretou maior sobrevida aos animais utilizados.

Tanto a inflamação maciça como a imunossupressão relacionadas à sepse podem ocasionar a Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (DMOS), cujo diagnóstico é realizado com a detecção de disfunção orgânica em um doente crítico. A disfunção orgânica denota a incapacidade de determinado órgão manter a homeostase do organismo e o termo síndrome refere-se à presença de sinais e sintomas progressivos patologicamente relacionados (BONE *et al*, 1992).

A SIRS e a CARS não são fases diferentes da mesma doença, mas sim distúrbios que ocorrem devido ao desequilíbrio entre mediadores pró e anti- inflamatórios. Desde o início do quadro séptico, há a produção de substâncias

capazes de estimular e inibir a resposta inflamatória. BENOIT *et al* (2008) identificaram a transcrição do gene relacionado ao IL1Ra logo após o desafio bacteriano juntamente com mediadores pró- inflamatórios, como TNF α e IL1 β .

PINSKY *et al* (1993) avaliaram as concentrações de citocinas séricas em pacientes sépticos e não sépticos. Entre os sépticos, dez desenvolveram DMOS e evoluíram a óbito e entre os não-sépticos, um desenvolveu a síndrome e sobreviveu. A presença de DMOS associou- se a maior mortalidade em relação aos pacientes que não a desenvolveram. A persistência de TNF α elevado (>12 horas) foi característico dos pacientes que apresentaram DMOS, independentemente do diagnóstico de sepse. Já PECK (2007), através da incubação de macrófagos peritoneais de ratos Wistar com o soro de pacientes sépticos, demonstrou que concentrações progressivamente mais baixas de TNF α , IL1 β e altas de IL10 relacionavam- se à evolução a sepse grave e choque séptico se comparadas àquelas referentes ao diagnóstico de sepse. Tais publicações denotam a complexidade da sepse, já que apresentam um mediador em comum, o TNF α , porém a primeira ilustra um quadro hiperinflamatório e a segunda evolução a CARS, alterações que em ambas acarretaram importante impacto na mortalidade no modelo experimental utilizado.

A resposta frente a uma infecção é variável entre os indivíduos. Importam para a determinação da suscetibilidade ao óbito por um agente infeccioso fatores como os genéticos, a idade e doenças preexistentes (BONE, 1996; HOTCHKISS e KARLS, 2003), tornando difícil estabelecer um padrão temporal em que SIRS e CARS acontecem. Desse modo, a fisiopatologia da sepse torna difícil a utilização de estratégias que visam a limitação ou o estímulo à resposta inflamatória de modo exclusivo, pois estas podem ser benéficas ou não na dependência da resposta do hospedeiro ao agente agressor.

2.5 OS ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGA 3 (AGPI ω 3) E A ATENUAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.

Os ácidos graxos são necessários à síntese de lipídeos e podem ser classificados em saturados, monoinsaturados ou polinsaturados (AGPI). Entre os polinsaturados, duas famílias ocorrem na natureza: a ômega 6 e a ômega 3, sendo a primeira derivada do ácido *Linoleico* (LA) e a última derivada do ácido α -*Linolênico* (ALA). Tais ácidos graxos podem ser sintetizados em plantas, mas não por células de mamíferos devido à ausência da enzima Δ 12 dessaturase. Desse modo, são considerados ácidos graxos essenciais a seres humanos devendo ser providos a partir da dieta (CHRISTIE, 2011).

Nas plantas, os AGPI derivam de ácidos graxos saturados, os quais são progressivamente dessaturados para formar o ácido graxo monoinsaturado oleico e os polinsaturados LA e ALA (URSIN, 2003). O LA é um importante componente dos óleos derivados de sementes, como os óleos de milho, soja e girassol, os quais podem conter 50 % ou mais de LA. O ALA constitui os lipídeos presentes em folhas e que fazem parte do aparato fotossintético de plantas, entre elas as algas. Encontra-se presente também na semente de linhaça, podendo constituir 75 % dos ácidos graxos presentes no óleo derivado desta semente. Ao serem ingeridos, sofrem ação de alongases e dessaturases (FIGURA 3) e originam seus principais derivados: o ácido araquidônico (ARA) e os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) respectivamente (CHRISTIE, 2011), os quais não são interconversíveis e competem pela mesma enzima, Δ 6 dessaturase. Tanto EPA como DHA podem ser encontrados em peixes marinhos, como sardinha, atum e linguado e em cápsulas de óleo de peixe disponíveis comercialmente.

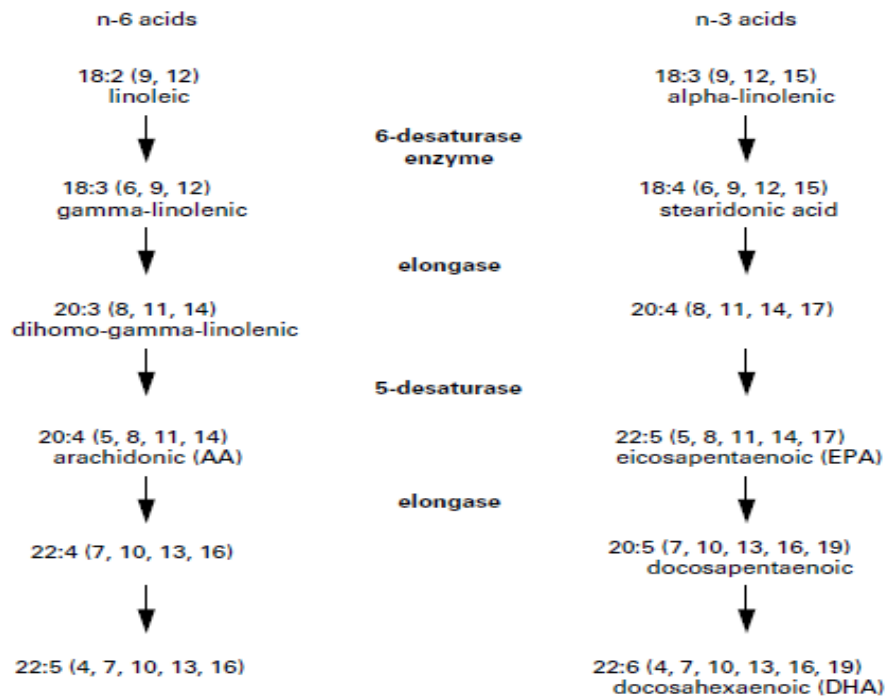


Figure 3 Metabolism of essential fatty acids.

FIGURA 3: Síntese de derivados dos ácidos graxos essenciais LA (ω 6) e ALA (ω 3).

FONTE: KURLAK e STEPHENSON (1999).

Os AGPI ω 3 são importantes para a atenuação da resposta inflamatória. Mudanças ocorridas na dieta ocidental (FIGURA 4), que incluem o menor consumo de AGPI ω 3, associam-se à maior prevalência de doenças crônicas caracterizadas por inflamação, como aterosclerose, hipertensão essencial, diabetes, obesidade e neoplasias (SIMOPOULOS, 1999 a,b). Fatores genéticos não explicam essa alteração, já que nossos genes são muito similares aos dos nossos ancestrais do Período Paleolítico (EATON e KONNER, 1985), sendo os principais fatores envolvidos e que caracterizam a população ocidental os seguintes: 1) aumento do consumo calórico e decréscimo no gasto de energia; 2) aumento do consumo de gordura saturada, AGPI ω 6 e ácidos graxos *trans* associado à diminuição de AGPI ω 3; 3) diminuição de carboidratos complexos e fibras; 4) aumento do aporte de cereais e decréscimo em frutas e vegetais; 5) diminuição de proteínas, antioxidantes e da ingestão de cálcio (SIMOPOULOS, 1999 a,b). Atualmente a dieta ocidental é deficiente em AGPI ω 3 e a relação AGPI ω 6/AGPI ω 3 encontra-se em torno de 15-25:1 (SIMOPOULOS, 1999a) enquanto na era Paleolítica se aproximava de 2-1:1 (EATON e KONNER, 1985).

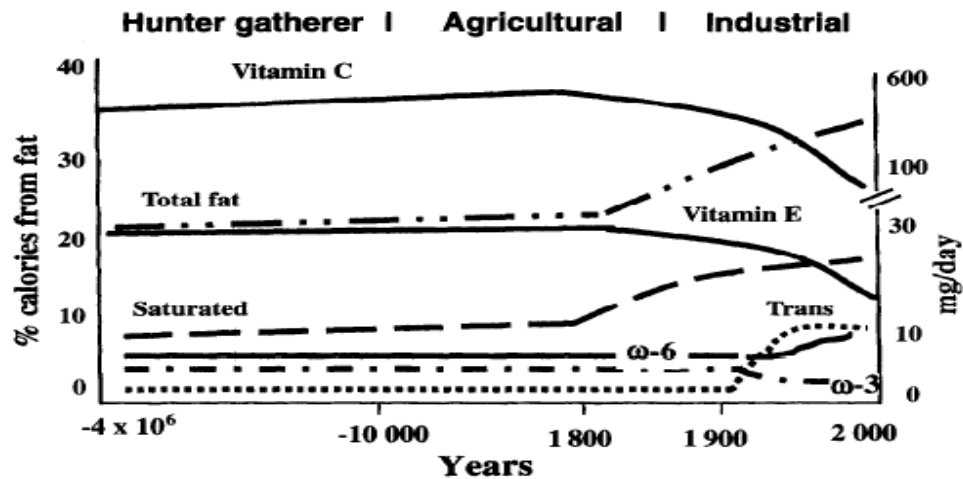


FIGURA 4: Esquema hipotético referente ao consumo de gordura, ácidos graxos e vitaminas E e C na nutrição humana, extrapolado a partir de análise de seção cruzada da sociedade de caçadores até a industrial.

FONTE: SIMOPOULOS 1999.

GALLI e CALDER (2009) relatam que mais importante que a razão entre os AGPI é a concentração absoluta de AGPI $\omega 3$ especialmente em células e tecidos, alertando para a necessidade de concentração mínima desses ácidos graxos para a expressão de suas atividades. Porém, BOUDREAU *et al* (1991) demonstraram que a relação entre eles também é essencial provavelmente devido à competição que existe entre os ácidos graxos por enzimas relacionadas à síntese de seus derivados. Administraram a ratos dietas com diferentes quantidades de óleo de peixe e ALA mantendo a mesma relação $\omega 6$: $\omega 3$ através da adição de óleo de girassol durante 03 semanas. Ou seja, o aumento em AGPI $\omega 3$ era compensado pelo maior aporte de AGPI $\omega 6$. Concluíram que a presença de óleo de peixe e ALA aumenta a incorporação de AGPI $\omega 3$, diminui a concentração de AA na membrana celular e reduz a produção de TBXB2, porém o aumento do aporte de óleo de peixe ou ALA na dieta não promoveu intensificação progressiva do efeito, fato atribuído à manutenção da razão $\omega 6$: $\omega 3$ constante, demonstrando influência desta sobre os efeitos biológicos dos AGPI $\omega 3$.

A importância dos ácidos graxos se deve à relação estabelecida entre estes e as diversas células do organismo, já que constituem substratos à síntese de fosfolípidos, os quais constituem 75 % dos lípidos presentes na membrana celular

e são importantes determinantes da fluidez da mesma (McMURCHIE, 1988). De acordo com LEHNINGER *et al* (2003), os glicerofosfolípidos (FIGURA 5) são os principais componentes das membranas biológicas. São constituídos de uma unidade básica de glicerol-3-fosfato esterificado a ácidos graxos e a um grupo X no seu grupo fosforil. A diversidade entre eles se deve principalmente à variedade de ácidos graxos que os compõem e por isso sua composição pode ser alterada de acordo com os ácidos graxos consumidos.

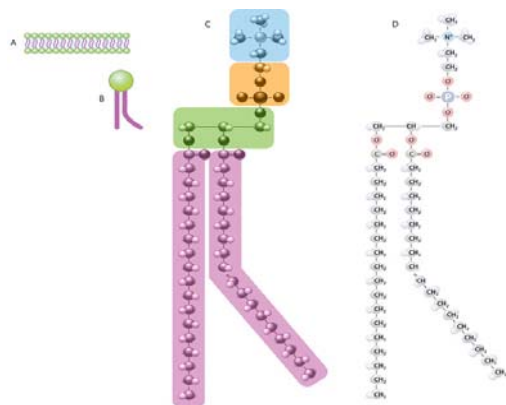


FIGURA 5: Estrutura molecular de um glicerofosfolípido. Grupo X (azul), grupamento fosfato (laranja), glicerol (verde), ácidos graxos (roxo).

FONTE: Cell Membranes. Scitable by Nature Education (2010) modificado.

A fluidez da membrana plasmática é principalmente influenciada pelo grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos fosfolípidos, pelas razões entre ácidos graxos saturados e polinsaturados e entre colesterol e fosfolípidos. Quanto maior o grau de insaturação, maior a fluidez da membrana, ocorrendo o oposto em relação à maior proporção entre ácidos graxos saturados e polinsaturados e entre colesterol e fosfolípidos. Desse modo, os AGPI influenciam as propriedades físico-químicas da membrana e podem promover diferentes interações entre lipídeos e proteínas, potencialmente resultando em alterações nas funções celulares (McMURCHIE, 1988).

Os fosfolípidos podem se organizar em microdomínios denominados *lipid rafts*, que consistem em regiões da membrana plasmática com composição estrutural característica, sendo ricos em esfingolipídeos, colesterol e fosfolípidos cujas cadeias laterais são constituídas principalmente por ácidos graxos saturados. A presença dessas moléculas promove o empacotamento de lipídeos, tornando essa

região menos fluida do que o restante da membrana. Proteínas ligadas à sinalização celular, como proteína G, receptores de fatores de crescimento, *mitogen- activated protein kinase* (MAPK) e proteína quinase C (PKC) encontram-se concentradas nestas regiões, as quais podem ser alteradas pela presença de AGP $\omega 3$. Schley¹ (2007, citado por CALDER 2007) cultivou células da linhagem MDA-MD-231 de câncer de mama humano e as suplementou com LA, EPA e DHA e observou incorporação desses ácidos graxos nos *lipid rafts*, o que provocou decréscimo do número de células neoplásicas durante o período. Atribuiu-se o efeito à maior quantidade de fosfatidilcolina e menor de esfingomielina após a suplementação, tendo a esfingomielina sofrido hidrólise e consequente liberação de ceramida, indutora da apoptose das células neoplásicas. Desse modo, a suplementação com AGP $\omega 3$ pode promover mudanças na composição dos fosfolípidos componentes dos *lipid rafts* com conseqüente alteração da sinalização intracelular (CALDER e YAQOOB, 2007).

Não somente a estrutura dos fosfolípidos contidos nos *lipid rafts* pode ter sua composição alterada pelos AGP $\omega 3$, mas também os contidos em toda membrana celular. A ingestão de óleo de peixe ou peixe ocasiona a substituição parcial dos AGP $\omega 6$ (principalmente ARA) pelos ácidos graxos EPA e DHA na membrana de monócitos, plaquetas, neutrófilos e linfócitos B e T (BARBOSA *et al*, 2010; GIBNEY e HUNTER, 1993; HEALY *et al*, 2000), sendo esta incorporação já identificada com 24 horas de suplementação através de nutrição parenteral em pacientes sépticos (BARBOSA *et al*, 2010) e atingindo um platô após 04 semanas em neutrófilos de indivíduos saudáveis suplementados com óleo de peixe por via oral (HEALY, 2000).

Em resposta a estímulos celulares, os fosfolípidos sofrem ação da enzima fosfolipase A2 e disponibilizam os ácidos graxos precursores da síntese de eicosanóides. Estes são mediadores químicos da resposta imunitária resultantes de catálises realizadas pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) sobre os ácidos graxos. Tais reações originam prostaglandinas (PG), tromboxanas (TBX) e leucotrienos (LT). Os derivados dos AGP $\omega 6$ incluem as PGs e TBXs da série 2 e LTs da série 4, enquanto os derivados dos AGP $\omega 3$, em particular a partir do EPA, constituem PGs e TBXs da série 3 e LT da série 5.

Os eicosanóides produzidos a partir dos AGP $\omega 6$ são mediadores importantes da inflamação e trombogênese. PGE2 é capaz de induzir febre e eritema, aumento

da permeabilidade vascular, vasodilatação e aumento da dor e do edema mediados pela histamina. Alterações estas consideradas pró- inflamatórias. Pode também desencadear a menor proliferação de linfócitos e células *Natural Killer* (NK) além de suprimir a produção de TNF α , IL2, IL6 e IL1 sem interferir na de IL4 e IL10, possuindo também efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. LTB4 aumenta a permeabilidade vascular, é um potente quimiotático para neutrófilos, aumenta a liberação de enzimas lisossomais, estimula a atuação de células NK, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, inibe a proliferação de linfócitos e aumenta a produção de TNF α , IL2, IL1, IFN γ e IL6, amplificando, desse modo, a inflamação. TBXA2 caracteriza-se por ser um potente vasoconstritor e agregante plaquetário. Em contraste, os eicosanóides provenientes de AGPI ω 3 são biologicamente menos potentes que os citados acima, contribuindo para a modulação da resposta inflamatória (CALDER, 2001; SIMOPOULOS, 1999b; GOGUS e SMITH, 2010).

Eicosanóides e docosanóides derivados de AGPI também servem à resolução da resposta inflamatória (FIGURA 6). São produzidos por neutrófilos e denominados lipoxinas, resolvinas e protectinas. Lipoxinas derivam do ácido araquidônico, enquanto resolvina E1 de EPA e resolvinas da série D e protectinas de DHA. As lipoxinas são eicosanóides que inibem o recrutamento de neutrófilos por interferirem na ativação endotelial (DAS, 2006), enquanto resolvinas e protectinas diminuem o infiltrado inflamatório e atenuam a ativação do NF κ B (SINGER *et al*, 2008).

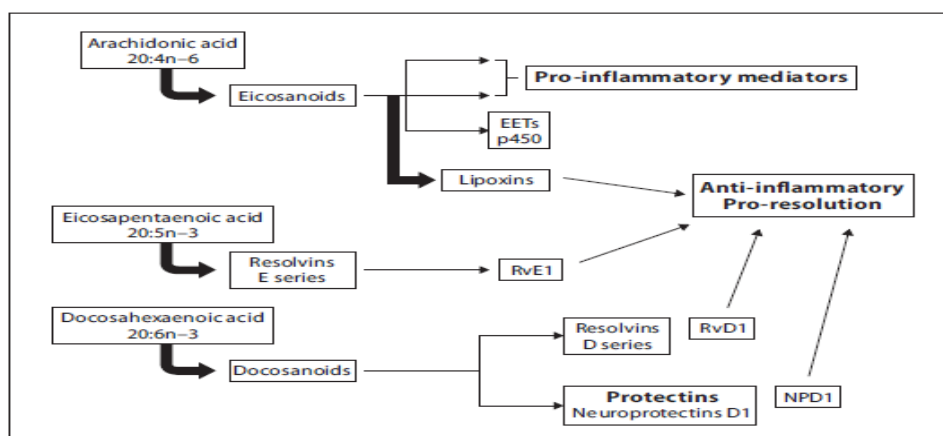


FIGURA 6: Produção de eicosanóides e docosanóides por AGPI ω 3 e ω 6.

FONTE: GALLI e CALDER (2009)

A comunicação entre as células, a qual envolve contato direto entre elas através de moléculas de adesão e mediadores químicos como citocinas, também pode ser afetada pelos AGPI ω 3.

Citocinas é o nome genérico para o conjunto de proteínas que inclui linfocinas (citocinas produzidas por linfócitos), monocinas (produzidas por monócitos), quimiocinas (citocinas dotadas de atividade quimiotática) e interleucinas (produzidas por leucócitos). Podem agir de modo autócrino, parácrino ou endócrino. São secretadas em resposta a estímulo imunológico e atuam em cascata, já que uma citocina estimula sua célula alvo à produção de outras citocinas. São capazes de aumentar ou diminuir a expressão de proteínas de membrana e influenciam a proliferação e a secreção de moléculas efetoras (GALLI e CALDER, 2009). As citocinas TNF α , IL1 β e IL6 são as principais citocinas produzidas por macrófagos ativados classicamente. São capazes de ativar neutrófilos, monócitos e macrófagos a fim de iniciar o combate a células tumorais e microorganismos, aumentam a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais e neutrófilos, estimulam a proliferação de linfócitos B e T e a produção de citocinas por outros tipos celulares além de induzir febre, perda do apetite, mobilização de proteínas e gorduras e síntese de proteínas de fase aguda (CALDER, 2001). A suplementação com AGPI ω 3 diminui as concentrações plasmáticas das citocinas TNF α , IL6 e IL1 β na presença de endotoxemia em camundongos (SADEGUI *et al*, 1999) e promove a diminuição da produção das mesmas citocinas por macrófagos de indivíduos saudáveis após estimulação *ex vivo* com LPS ao mesmo tempo em que eleva a produção de citocinas regulatórias, como IL10 e TGF β (SIERRA *et al*, 2006).

Em relação às moléculas de adesão, os AGPI ω 3 diminuem as concentrações de VCAM-1 e E-selectina solúveis no plasma de indivíduos saudáveis (THIES *et al*, 2001), o que pode acarretar prejuízo à transmigração endotelial de células inflamatórias. TULL *et al* (2009) observou menor migração de neutrófilos humanos cultivados com EPA em resposta a TNF α , porém não verificou menor expressão de E-selectina ou VCAM-1 pelas células endoteliais, mas sim alteração no processo de migração por mecanismo COX dependente, já que a incorporação de EPA nas células endoteliais originou PGD3 ao invés de PGD2, eicosanóide derivado do AA

que favorece a diapedese de neutrófilos. Desse modo, vários são os mecanismos pelos quais os AGPI ω 3 podem afetar a interação entre as células.

O mecanismo pelo qual os AGPI ω 3 atenuam a resposta inflamatória pode envolver alterações relacionadas à transcrição gênica, em particular a inibição à ativação do NF κ B e o aumento da atividade dos fatores transcricionais *peroxissomal proliferator activators* (PPAR). O NF κ B encontra-se na forma inativa no citosol das células inflamatórias em repouso. Quanto há estímulo inflamatório, migra ao núcleo e induz a transcrição de genes pró- inflamatórios relacionados à COX2, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, TNF α , IL1 β , IL6, óxido nítrico sintetase e proteínas de fase aguda (CALDER, 2003). Os PPARs são importantes na regulação da expressão gênica pelos AGPI. Ácidos graxos livres e seus derivados, como eicosanóides, são os principais sinais envolvidos no efeito transcricional dos AGPI relacionado aos PPARs. Existem três tipos destes fatores: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ (GALLI e CALDER, 2009). PPAR α e PPAR γ encontram-se presentes em vários tecidos, mas também em células inflamatórias. O aumento da atividade desses fatores possui atividade anti-inflamatória e parece ser estimulada pelos AGPI ω 3. A ativação desses fatores transcricionais promove a inibição à transcrição de genes pró-inflamatórios relacionados à produção de TNF α , IL1 β , IL6 ,IL8, COX 2, VCAM-1, óxido nítrico sintetase e proteínas de fase aguda (CALDER, 2003).

Assim, considerando a alteração no comportamento alimentar da população mundial, em especial da ocidental, no que diz respeito ao consumo de AGPI ω 3 e a elevada morbi- mortalidade ocasionada pela sepse, estudos referentes à evolução deste quadro no que concerne ao sistema imunitário quando da presença de AGPI ω 3 são importantes. Até o momento parece não haver nenhum estudo que tenha investigado o efeito de alteração da razão ω 6: ω 3 para próxima da recomendada sobre a resposta imunitária de neutrófilos e macrófagos em animais submetidos à indução da endotoxemia, modelo experimental de sepse empregado neste trabalho.

3 OBJETIVO:

Devido ao potencial imunomodulador dos AGPI $\omega 3$ e a elevada morbimortalidade ocasionada pela sepse em todo o mundo associados às alterações alimentares ocorridas na dieta ocidental, este trabalho investigou o impacto do consumo balanceado de AGPI $\omega 6$ e AGPI $\omega 3$ sobre as funções de células do sistema imune inato, particularmente neutrófilos e macrófagos, em resposta à indução de endotoxemia em ratos mediante:

- 1) Coleta de macrófagos peritoneais e realização dos ensaios referentes a fagocitose, retenção de vermelho neutro e produção de ânion superóxido.
- 2) Coleta de neutrófilos sanguíneos e realização dos ensaios referentes a fagocitose, retenção de vermelho neutro, produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas- Universidade Federal do Paraná- conforme constatado no certificado 436.

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus) obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Campus Centro Politécnico, UFPr, Curitiba, Paraná. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada a 22 ± 1 °C e livre acesso a água e alimento. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

O estudo utilizou 60 animais com 60 dias de vida (peso inicial entre 230 e 332 g) e que foram separados nos seguintes grupos de acordo como tipo de ração ofertada: controle (C n=12), $\omega 3$ (N3 n=12), $\omega 6$ (N6 n=12), razões $\omega 6$: $\omega 3$ 7:1 (R7 n=12) e 14:1 (R14 n=12).

As rações foram preparadas semanalmente, armazenadas a - 20 °C e analisadas quanto ao perfil lipídico da dieta por HPLC. Todos os cuidados foram tomados para que as dietas permanecessem inalteradas durante o período experimental. À ração NUVILAB CR-1 misturou-se os óleos abaixo para se atingir as razões $\omega 6$: $\omega 3$ desejadas.

COMPOSIÇÃO	Ração controle ●	Ração N3	Ração R7	Ração R14	Ração N6
Carboidratos ●	52%	52%	52%	52%	52%
Proteínas ●	22%	22%	22%	22%	22%
Lipídios	4%	30%	30%	30%	30%
Saturados *	1,12%	10%	10%	10%	10%
Polinsaturados**	2,85%	20%	20%	20%	20%
N-3 (g)	-	161,5g	27 g	8 g	-
N6 (g)	-	-	134,5g	153,5g	161,5 g

● GUIMARÃES (1992).

* representa acréscimo de 101 g de gordura de coco.

** representa acréscimo de 161 g de óleo de girassol ou peixe.

QUADRO 1: Composição das dietas ofertadas aos animais.

FONTE: PIZATO (2005).

O óleo de girassol (SALADA- BUNGE ALIMENTOS) foi escolhido porque apresenta de 50 a 75% de seus ácidos graxos na forma de ácido *linoleico* ($\omega 6$) e o óleo de peixe (cápsulas gentilmente cedidas por HERBARIUM LABORATÓRIO BOTÂNICO, Paraná, Brasil) por apresentar 19,1% de ácido *eicosapentaenóico* (EPA) e 13,4% ácido *docosahexaenóico* (DHA), ambos AGPI $\omega 3$.

Para a preparação das rações utilizadas nos experimentos foi utilizada ração em pó (NUVILAB CR-1) e a esta acrescidos os ácidos graxos conforme o tipo de ração a ser administrada a cada grupo. Os ingredientes foram homogeneizados manualmente e após o preparo as rações foram fracionadas em pequenos lotes e mantidas em sacos plásticos a - 20 °C e ofertados 30g a cada animal diariamente. A quantificação da ingestão alimentar foi realizada diariamente.

Os ratos foram pesados no primeiro dia de oferta das dietas, 15 dias após o início da suplementação e no dia anterior à realização do experimento.

Após 30 dias de administração das diferentes rações, em metade de cada grupo foi inoculado com a endotoxina *Escherichia coli* Serotype 0111:B4 (LPS Sigma) na dose de 10 mg/kg intraperitonealmente (ip) e na outra metade foi administrada solução salina 0,9% ip, resultando 10 subgrupos: C, R7, R14, N3 e N6 e CLPS, R7LPS, R14LPS, N3LPS, N6LPS, num total de 6 ratos/grupo. Todos os animais foram ortotansados por decapitação para obtenção de sangue para isolamento dos neutrófilos e de lavado peritoneal para coleta de macrófagos. Os ratos dos grupos inoculados com LPS foram ortotansados após três horas da indução da endotoxemia.

4.2 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

4.2.1 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS A PARTIR DO SANGUE PERIFÉRICO

O isolamento de neutrófilos a partir do sangue periférico foi realizado conforme descrito por BOYUN, 1976, modificado por BONATTO (2008). O sangue coletado após a decapitação dos animais foi contido em tubos tipo falcons com heparina e submetido a centrifugação a 150 g a 18 °C por 10 minutos. O plasma foi separado e o restante do sangue transferido a outro tubo tipo falcon de 50 ml e a este acrescentado o mesmo volume de PBS. Aos tubos contendo 5 ml de Ficoll-Histopaque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia) foram adicionados cuidadosamente 10 ml da mistura de sangue e PBS na proporção 1:1 para centrifugação a 400 g por 50 minutos a 20°C.

Após centrifugação, obteve-se a interface constituída por linfócitos e monócitos, sobrenadante e sedimento, o qual é constituído por hemáceas e polimorfonucleares (FIGURA 7). O sedimento foi transferido para outro tubo e submetido à lise hipotônica duas vezes por incubação com solução hemolítica (TrisBase (trishidroximetilmetano) 17,0 mM e NH₄CL 18,7mM) em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. A solução foi centrifugada a 150 g por 10 minutos, o

sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em PBS. A viabilidade celular foi verificada por contagem em Câmara de Neubauer após coloração com Azul de Tripan 1% com auxílio de microscopia de luz.

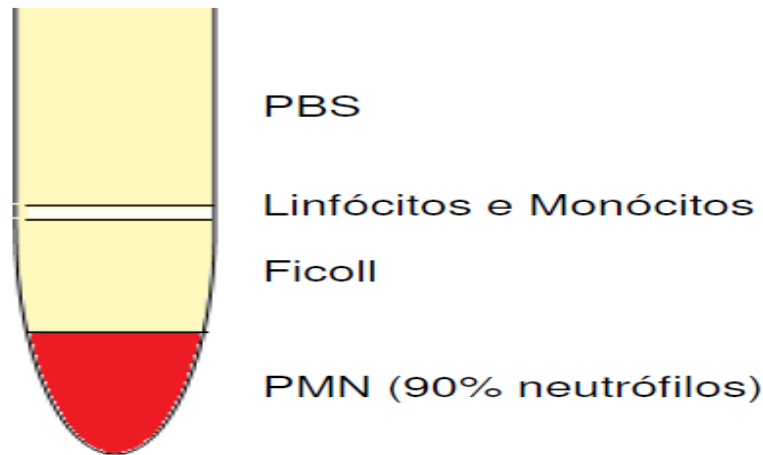


FIGURA 7: Separação de células sanguíneas em Ficoll Histopaque.

FONTE: BONATTO (2008)

4.2.2 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DO LAVADO PERITOENAL

Após a decapitação dos animais, a pele da região abdominal foi removida e realizada a injeção de 20 ml tampão fosfato- salina estéril (PBS), pH 7,4. O abdome foi massageado durante 30 segundos para promoção do deslocamento de células da parede interna da cavidade peritoneal. A cavidade foi aberta e o fluido contendo as células retirado com pipeta tipo Pasteur, sendo em seguida centrifugado em tubos falcon a 150 g por 5 min a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, os macrófagos foram ressuspensos em 2ml de PBS e a viabilidade celular verificada através de contagem em câmara de Neubauer após coloração com Azul de Tripan 1% com auxílio de microscopia de luz.

4.3 AVALIAÇÕES DE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS DE NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS.

4.3.1 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos e macrófagos foi medida conforme descrição de PICK e MIZEL, 1981, modificado por BONATTO (2008). Através da oxidação do vermelho fenol pela peroxidase foi possível a detecção da produção de peróxido de hidrogênio. Alíquotas de 100 μL das soluções de neutrófilos ou macrófagos, contendo 1×10^6 células/ml foram colocados em placas tipo ELISA. Cada escavação recebeu 100 μL da solução de vermelho fenol (0,56mM), glicose (5mM) e zymosan e a placa foi incubada no escuro por uma hora a 20°C. Após esse período foi adicionado NaOH para interrupção da reação e a absorbância medida por espectrofotometria a 620 nm. Os resultados foram expressos em absorbância/ 10^6 células/mL.

4.3.2 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO.

A geração de superóxido foi estimada através da redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT – Sigma), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI e DAS, 1994). As células contidas em 100 μL (1×10^6 células/mL) foram incubadas por uma hora, em placa de 96 escavações contendo 0,2% de NBT em PBS a 37 °C. Neste passo, ocorre a redução do NBT a um composto azul e insolúvel no PBS, denominado formazan, numa reação promovida pelo ânion superóxido. A placa foi então centrifugada a 240 g por 5 minutos, o conteúdo desprezado e adicionados 100 μL de metanol 50% para fixar as células. Após 10 minutos a placa foi centrifugada novamente, o conteúdo desprezado e seco com ar quente. Foi então adicionado 120 μL de KOH 2M e 140 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilizar o NBT. Após 30 minutos procedeu-se a leitura das placas a 550 nm utilizando-se leitor de microplacas (Microplate reader Bio-rad- Benchmark). Os dados foram expressos em absorbância/ 10^6 células/mL.

4.3.3 RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO.

Para esta análise foi utilizado o método descrito por PIPE *et al.*, 1995, modificado por BONATTO (2008), no qual se utilizou placa de 96 escavações, onde foram adicionados 100 μL da solução de macrófagos ou neutrófilos contendo 1×10^6 células/mL e adicionados 20 μL da solução de vermelho neutro a 2% (20 mg de vermelho neutro em 1 mL de DMSO). Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 240 g e o sobrenadante descartado. Foram adicionados então 100 μL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava no interior das vesículas de secreção. Finalmente, após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando leitor de microplacas (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos por absorvância/ 10^6 células/mL.

4.3.4 ATIVIDADE FAGOCITÁRIA

Foi utilizado o método descrito por PIPE *et al.*, 1995, modificado por BONATTO (2008). Foram depositados 100 μL da solução de neutrófilos ou macrófagos, contendo 1×10^6 células/mL em placa de 96 escavações. Em seguida foram adicionados 10 μL de *zymosan* ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e procedida a incubação por 30 minutos a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 100 μL de fixador de Baker para interrupção do processo de fagocitose e, 30 minutos depois, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 240 g a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelas células. O vermelho neutro no interior dos neutrófilos foi solubilizado utilizando-se 100 μL de solução de extração. Após 30 minutos a leitura das placas foi realizada a 550 nm utilizando leitor de microplaca (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle basal (C).

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY- HPLC).

4.4.1 Extração Lipídica de alíquotas das rações preparadas.

Foi realizada conforme o método descrito por FOLCH *et al* (1957). Cem miligramas de cada amostra de ração foram utilizados para a extração. Após a pesagem foi acrescentado ao tubo de vidro contendo a ração 1,33 ml de solvente extrator composto por metanol:clorofórmio, 1:2, vol:vol. O material foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador (Bosch^R GGS 27). Após homogeneização, foram adicionados 480 µL de metanol ao homogenato e o material foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro e nele adicionados 960 µL de clorofórmio (para manutenção da proporção metanol: clorofórmio 1:2 v:v). Na sequência foram adicionados 550 µL de água ultrapura, o que acarretou a formação de sistema bifásico, o qual foi submetido à intensa agitação até não serem mais distinguíveis as duas fases. Cerca de 10 minutos depois, após reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido com o auxílio de uma micropipeta e foi adicionado 1 ml de Solução de Folch (metanol 48,98 %; água 47,96%; clorofórmio 3,06 %; MgCl₂ 0,017 %; CaCl₂ 0,02%; NaCl 0,37 %) lentamente de modo que a parede do tubo fosse lavada com esta solução. Em seguida o sobrenadante foi removido. Tal procedimento foi repetido mais duas vezes e o infranadante submetido a secagem em nitrogênio gasoso.

4.4.2 Saponificação dos extratos lipídicos obtidos.

Os extratos lipídicos obtidos das alíquotas das rações foram ressuspensos em 100 µL de metanol e saponificados com 2,0 ml de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1 M em metanol a 90 %) a 37 °C por 2 horas em banho-maria sob agitação. A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0 com 1,5 ml de ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos foram extraídos 3 vezes com 2,0 ml de hexano. O solvente (hexano) foi evaporado em nitrogênio gasoso e as amostras guardadas protegidas da luz a -20 °C, até a derivatização com 4- bromometil-7-metóxi coumarina (BMMC).

4.4.3 Derivatização do ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por ABUSHUFA *et al* (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMMC em 10 ml de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18- crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio em 5 ml de acetonitrila. O reagente 2 foi sonificado por 30 minutos e outros 5 ml de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução estocada a 4-8 °C. As amostras contendo os ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 µL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex por 30 segundos. Após este período foram adicionados 100 µL de reagente 1 e 100 µL de reagente 2. As amostras foram novamente homogeneizadas mantidas a 60 °C por 15 minutos em placa aquecedora e em seguida transferidos para frascos apropriados para injeção em HPLC.

4.4.4 Obtenção dos cromatogramas por HPLC

Após extração lipídica, saponificação dos extratos e derivatização dos ácidos graxos obtidos, as amostras foram injetadas em um sistema HPLC- Varian com uma bomba (modelo ProStar 230), autoinjeter (mod ProStar 410) e detector de fluorescência (mod ProStar 363). A coluna analítica para separação dos ácidos graxos derivatizados utilizada foi da marca Varian, Microsorb-MV C-8 de fase reversa, com 250 nm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro, contendo partículas de 5 µm. O software para integração e registro de dados foi o Star 6.2 Chromatography Wokstation.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média e foram submetidos a análise de variância de duas vias seguido de pós- teste de Bonferroni, com nível de significância para $p < 0,05$, tendo como fatores a dieta e o LPS inoculado. O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prism versão 5.0.

5 RESULTADOS:

5.1 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS UTILIZADAS

DIETA	Ácido Linoleico + Ácido Araquidônico●	Ácido α linolênico + EPA + DHA●	Razão AGPI $\omega 6:\omega 3$
C	31,6	<0,5	>300
R7	37,4	5,1	7,3
R14	36,1	2,5	14,44
N3	4,7	21,3	0,22
N6	54,4	<0,1	>550

FIGURA 8: Composição das dietas utilizadas. EPA, ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosahexaenóico; AGPI, ácido graxo poliinsaturado; C, dieta padrão (controle); R7, dieta na razão AGPI $\omega 6:\omega 3$ 7:1; R14, dieta na razão AGPI $\omega 6:\omega 3$ 14:1; N3, dieta suplementada com óleo de peixe; N6, dieta suplementada com óleo de girassol.

- Porcentagem de ácidos graxos.

5.2 PESO DOS ANIMAIS NO INÍCIO E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DAS DIFERENTES DIETAS.

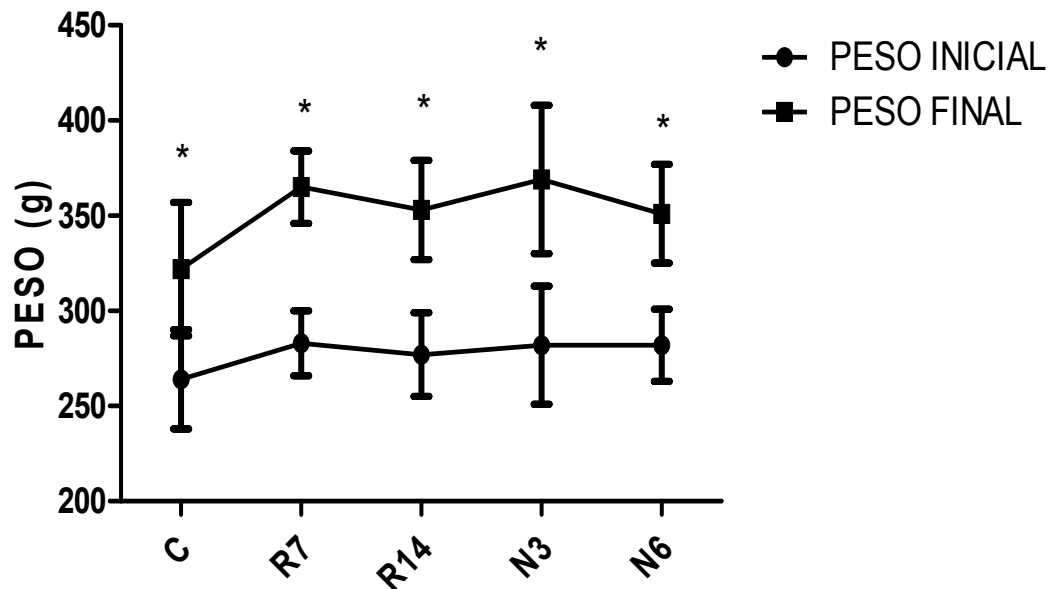


FIGURA 9: Peso dos animais antes e após a administração das diferentes dietas. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ vs peso inicial do grupo respectivo.

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos pesos dos animais antes ou após a oferta das dietas ($p > 0,05$). Após 04 semanas de administração das dietas, houve aumento significativo dos pesos dos animais se comparados aos respectivos pesos iniciais de cada grupo ($p < 0,05$).

5.3 FAGOCITOSE POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.

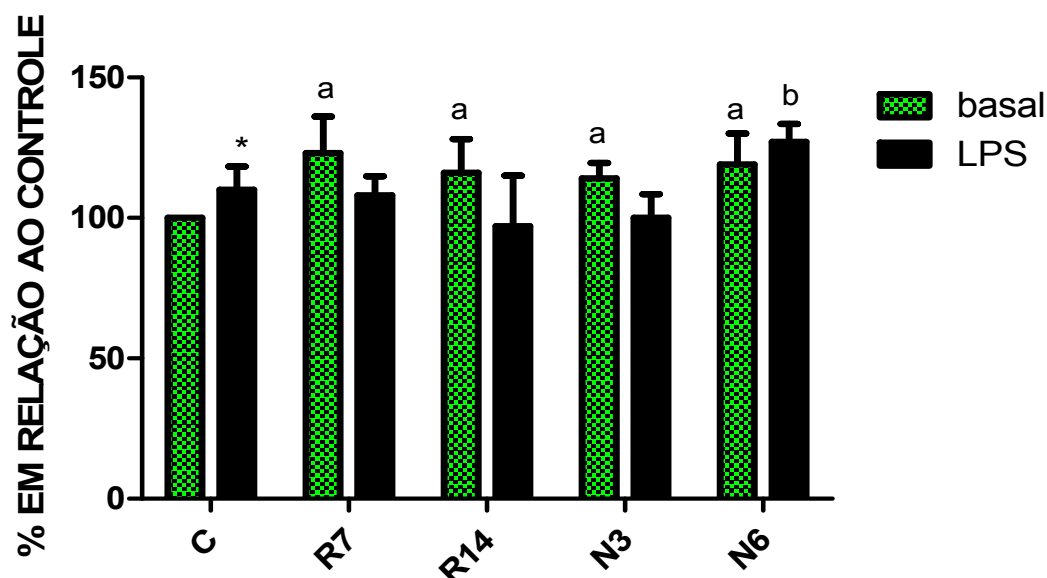


FIGURA 10. Fagocitose de *zymosan* pelos macrófagos peritoneais obtidos de ratos alimentados com dietas padrão, rica em óleo de peixe(N3) ou óleo de girassol (N6) e na razões $\omega 6:\omega 3$ 7:1 e 14:1 nos estados basal e estimulado com LPS. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata.

* $p < 0,05$ vs. basal; ^a $p < 0,05$ vs. C sem estímulo; ^b $p < 0,05$ vs. C, R7, R14 e N3 com LPS.

A fagocitose pelos macrófagos peritoneais, na situação sem estímulo (basal), elevou-se significativamente em todos os grupos suplementados com as diferentes rações quando comparada à do controle ($p < 0,05$). A adição do LPS elevou significativamente a fagocitose (10%) no grupo alimentado com ração controle ($p < 0,05$). Houve diferença estatística na fagocitose dos macrófagos dos grupos LPS-estimulados apenas no grupo suplementado com óleo de girassol (N6) quanto comparado à dos demais grupos ($p < 0,05$).

5.4 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.

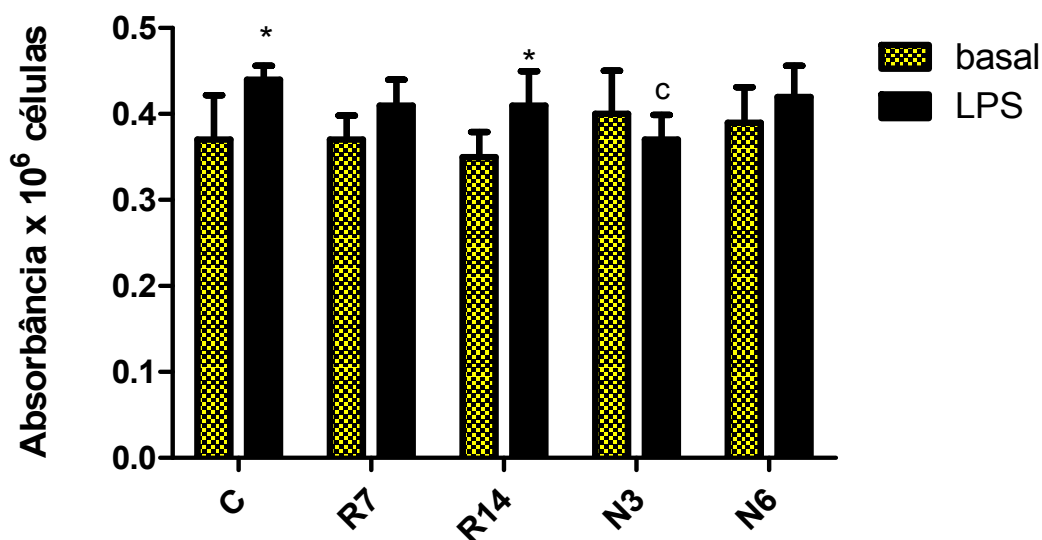


FIGURA 11. Produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais obtidos de ratos alimentados com dietas padrão, rica em óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) e nas razões $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 e 14:1 nos estados basal e estimulado com LPS. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata. * $p < 0,0001$ vs basal; [^] $p < 0,05$ vs. C, R7, R14 e N6 com LPS.

A produção de anion superóxido pelos macrófagos peritoneais na situação não estimulada (basal) não foi diferente entre os grupos suplementados distintamente ($p > 0,05$). A presença de LPS estimulou a produção de maneira significativa no grupo controle (18,9%; $p < 0,05$) e na razão $\omega 6:\omega 3$ 14:1 (17,1%; R14), não havendo alteração nos demais grupos ($p > 0,05$). Nos grupos LPS-estimulados, a suplementação com óleo de peixe (grupo N3) impediu elevação similar à dos demais grupos sendo esta menor quando comparada à dos grupos controle (C) e com as diferentes suplementações.

5.5 CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS.

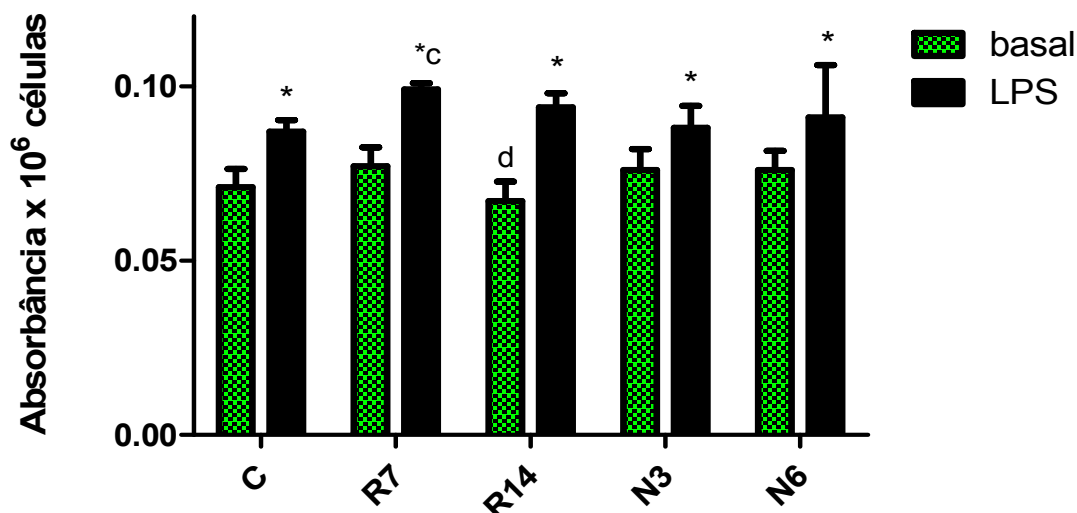


FIGURA 12. Captação de vermelho neutro pelos macrófagos peritoneais obtidos de ratos alimentados com dietas padrão, rica em óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) e nas razões $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 e 14:1 nos estados basal e estimulado com LPS. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ vs. basal; ^c $p < 0,05$ vs C e N3 LPS-estimulados; ^d $p < 0,05$ vs. R7, N3 e N6.

Na ausência de estímulo (basal), a captação de vermelho neutro pelos macrófagos peritoneais foi menor apenas no grupo suplementado com a razão $\omega 6:\omega 3$ de 14:1 (R14) quando comparada á dos demais grupos com as diferentes suplementações ($p < 0,05$ vs. R7, N3 e N6), mas não foi diferente da do controle ($p > 0,05$). A adição de LPS elevou significativamente a captação de vermelho neutro em todos os grupos, quando comparada a condição sem estímulo ($p < 0,001$ vs. basal). Entre os grupos LPS-estimulados, a captação de vermelho neutro foi significativamente maior no grupo suplementado com a razão $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 (R7) quando comparada á dos grupos controle e suplementado com óleo de peixe (N3) ($p > 0,05$), não sendo diferente se comparada à dos demais grupos ($p < 0,05$).

5.6 FAGOCITOSE POR NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS.

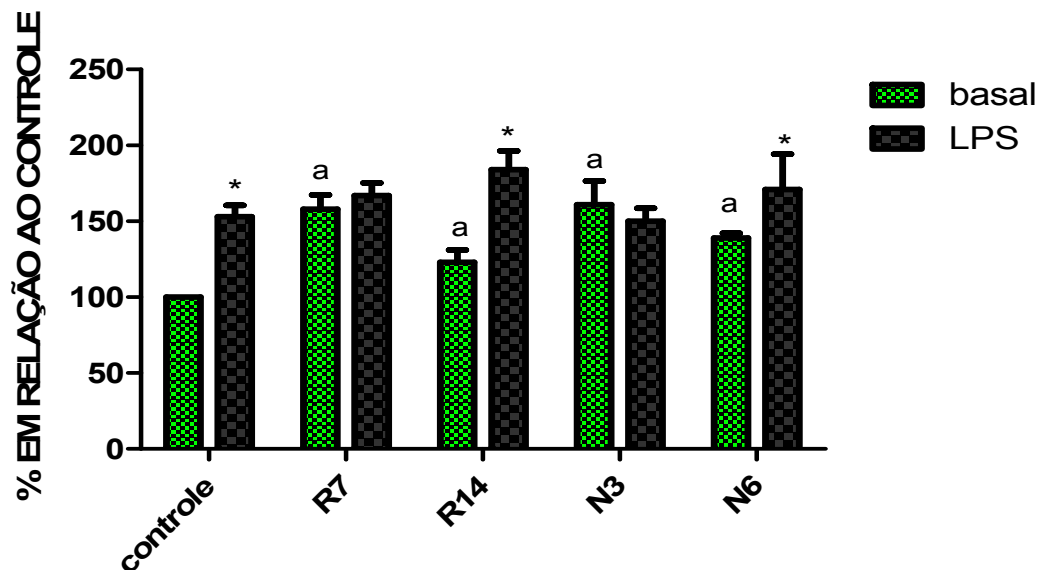


FIGURA 13. Fagocitose de *zymosan* pelos neutrófilos sangüíneos obtidos de ratos alimentados com dietas padrão, rica em óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) e nas razões $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 e 14:1 nos estados basal e estimulado com LPS. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ vs. basal; ^a $p < 0,05$ vs. C-basal

Na situação sem estímulo (basal) todas as suplementações incrementaram significativamente a fagocitose quando comparadas à do controle ($p < 0,001$), sendo as da razão 14:1 (R14) e da suplementação com óleo de girassol (N6) menores que às dos grupos R7 e N3, embora sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Na ausência de estímulo (LPS), houve elevação de 53% na capacidade fagocitária no grupo sem suplementação (C-LPS), de 49,5% na razão 14:1 (R14LPS) e a do grupo com óleo de girassol também se elevou, mas a elevação não foi significativa. Em virtude da razão 7:1 (R7LPS) e da suplementação com óleo de peixe (N3LPS) na situação basal já estarem com a fagocitose elevada, a presença de LPS não provocou elevação adicional significativa ($p > 0,05$).

5.7 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELOS NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS.

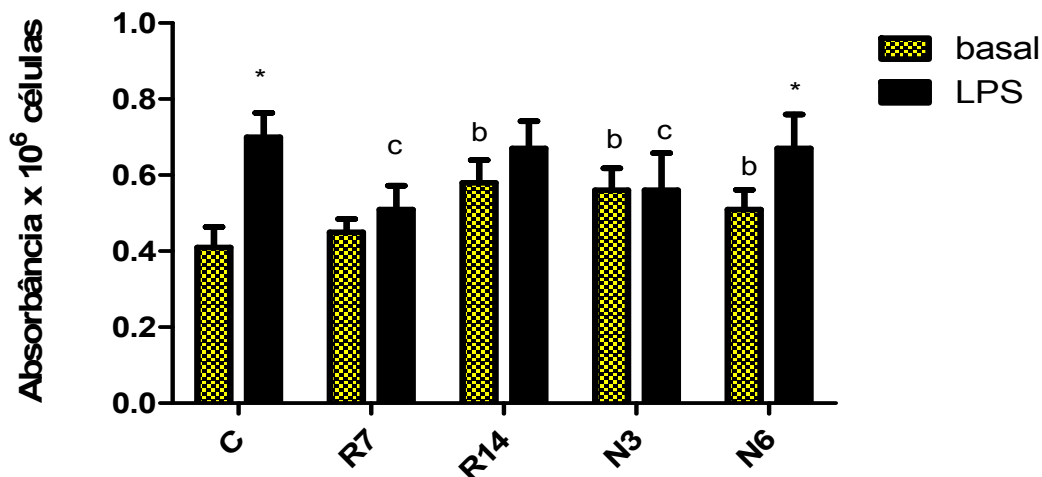


FIGURA 14. Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos alimentados com dietas padrão, rica em óleo de peixe (n3) ou óleo de girassol (N6) ou nas razões $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 e 14:1 nos estados basal e estimulado com LPS. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata. * $p < 0,001$ vs. basal; ^b $p < 0,001$ vs. C- e R7-basal; ^c $p < 0,05$ vs C-R14-N6-LPS

Na ausência de estímulo (basal), as suplementações com óleo de peixe (N3), óleo de girassol (N6) e razão 14:1 elevaram significativamente a produção de anion superóxido quando comparadas às dos grupos controle e razão 7:1 ($p < 0,001$). A adição de LPS elevou significativamente ($p < 0,001$) a produção apenas nos grupos controle (C) e suplementado com óleo de girassol (N6) quando comparados à ausência de estímulo (basal). Entre os grupos estimulados com LPS, a razão 7:1 (R7LPS) e a suplementação com óleo de peixe (N3LPS) apresentaram menor produção ($p < 0,001$) quando comparadas à dos demais grupos (C-R14-N6-LPS).

5.8 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS.

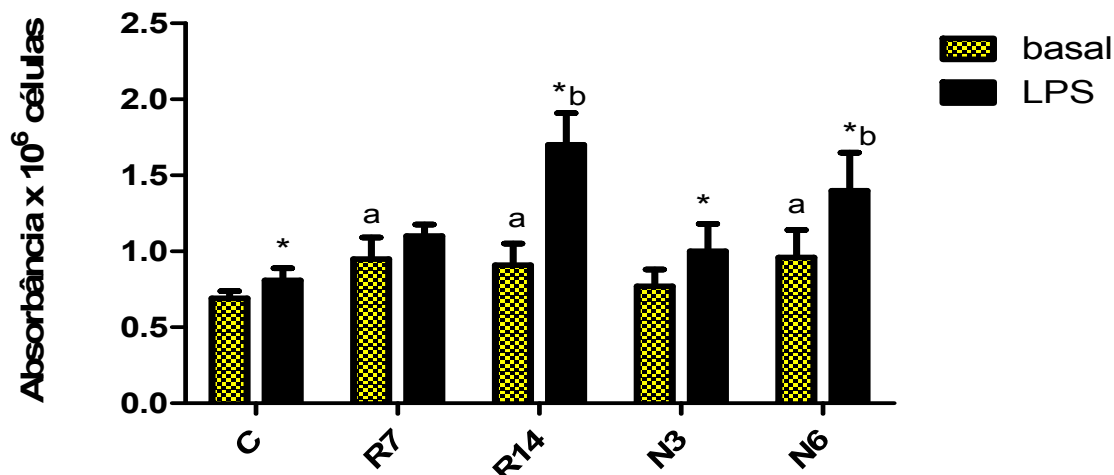


FIGURA 15. Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos alimentados com dietas padrão, rica em óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) ou nas razões $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 e 14:1 nos estados basal e estimulado com LPS. Os dados estão apresentados como média \pm DP de dois experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ vs basal; ^a $p < 0,001$ vs C-basal; ^b $p < 0,001$ vs C-R7-N3-LPS

Na ausência de estímulo, a produção basal de peróxido de hidrogênio só não foi diferente no grupo suplementado com óleo de peixe ($p > 0,05$) quando comparada à do controle, nos demais foi significativamente maior ($p < 0,05$ vs. C). O estímulo com LPS incrementou significativamente ($p < 0,001$) a produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos dos animais controle (C-LPS), suplementados com a razão 14:1 (R14LPS), óleo de peixe (N3LPS) e óleo de girassol (N6LPS) quando comparados à ausência de estímulo (basal). Entre os grupos estimulados com LPS, a razão 14:1 (R14LPS) e a suplementação com óleo de girassol (N6LPS) incrementaram em muito a produção quando comparadas à dos demais grupos ($p < 0,001$).

5.9 CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO PELOS NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS.

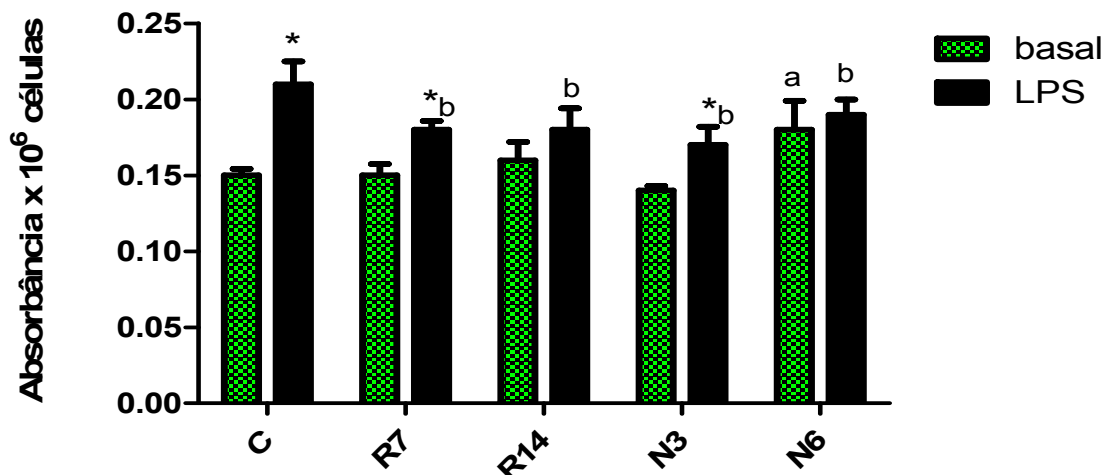


FIGURA 16. Captação de vermelho neutro pelos neutrófilos sanguíneos de ratos alimentados com dietas padrão (C e CLPS), ricas em óleo de peixe (N3 e N3LPS) ou óleo de girassol (N6 e N6LPS) e nas razões $\omega 6:\omega 3$ 7:1 (R7 e R7LPS) e 14:1 (R14 e R14LPS). Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p<0,05$ vs basal; ^a $p<0,001$ vs C-R7-R14-N3-basal; ^b $p<0,001$ vs C-LPS

Na ausência de estímulo (basal), somente a suplementação com óleo de girassol (N6) elevou a captação de vermelho neutro significativamente quando comparada à dos demais grupos ($p<0,05$). A adição de LPS estimulou a captação de vermelho neutro em todos os grupos ($p<0,05$), exceto na razão 14:1 (R14), sendo esta similar ao estado basal ($p>0,05$). Entre os grupos LPS-estimulados, somente no grupo sem suplementação (C) a captação de vermelho neutro foi maior quando comparada à dos demais grupos ($p<0,05$).

6 DISCUSSÃO:

6.1 Considerações sobre o delineamento experimental: indução de endotoxemia, dosagem e via de administração do lipopolissacáride.

Conforme exposto anteriormente com base em dados epidemiológicos, a sepse possui incidência crescente e mortalidade elevada em todo mundo, tornando tal síndrome um enorme desafio para a comunidade científica. Figura como a principal causa de óbito nas unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras SALES JÚNIOR *et al* (2006) e é a principal causa de óbito em UTIs não cardíacas com taxas de mortalidade que podem chegar a 60 % (VINCENT *et al*, 2009).

Considerando a importância das bactérias Gram negativas como microorganismos causadores da sepse, optou-se por utilizar neste trabalho inóculo de LPS extraído de *Escherichia coli* (*E.coli*) com o objetivo de provocar endotoxemia.

A utilização da endotoxina derivada de bactérias Gram negativas em modelos animais de sepse é comum. Tal modelo foi escolhido devido à possibilidade de utilização de inóculo purificado, cuja dose pode ser controlada e padronizada em todos os experimentos (POLI-de-FIGUEIREDO, 2008). A via de inoculação intraperitoneal (ip) possui vantagens sobre a via endovenosa (ev), pois se correlaciona melhor com o que ocorre na clínica, na qual o processo decorre da presença de um foco infeccioso com posterior disseminação do microorganismo ou de seu componente por contigüidade, por disseminação linfática ou hematogênica e não da inoculação direta do mesmo na corrente sanguínea (BENJAMIN, 2001).

As doses utilizadas na literatura variam de 4 a 35 mg/kg peso corpóreo em ratos (IBA *et al*, 2009; FROTKIS *et al*, 2010; TAVARES e MINANO, 2010; JAKUBOWSKI *et al*, 2009; JACKSON *et al*, 2000; LIM *et al*, 2004; LANDSBERGER *et al*, 2010; HEIDEMANN e GLIBETIC, 2007; LEHMANN *et al*, 2006; BIRNBAUM *et al*, 2006; IBA e MIYASHO, 2008; BERNARD *et al*, 1998; MACRI *et al*, 2009), variando-se a via de administração: ev ou ip. FROTKIS *et al* (2010) e TAVARES e MINANO (2010) relataram a dose letal de 15 mg/kg ip. A concentração de 10 mg/kg

ip foi utilizada no estudo realizado por MACRI *et al* (2009) e nele foi possível verificar algumas alterações laboratoriais que ocorrem em caso de sepse, como plaquetopenia, aumento de enzimas hepáticas, do tempo de protrombina (TAP), de IL6, de TNF α e de bastonetes. Além disso, foi realizada a detecção de endotoxina sérica com resultado positivo nos grupos em que ela foi administrada. Tal dose foi então testada em experimento piloto, observando-se alterações inflamatórias através dos ensaios utilizados nesta dissertação condizentes com o estado de endotoxemia. A dose então foi mantida no experimento posterior.

No presente estudo, alterações ocorreram nas capacidades das células estudadas entre os grupos estimulados e não estimulados com LPS. A suplementação dos animais foi realizada durante 04 semanas (FIGURA 8) e os animais apresentaram boa aceitação, tendo sido registradas sobras de 3% e 1,5% do total da dieta administrada nos grupos R7 e R14 durante todo período. Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso dos animais antes e após a suplementação alimentar (FIGURA 9).

A seguir será realizada a discussão em três partes: 1) efeito das diferentes suplementações alimentares sobre parâmetros imunitários de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais NÃO estimulados; 2) efeito da administração de LPS sobre parâmetros imunitários de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais obtidos de ratos alimentados com dieta padrão (grupos C e CLPS); 3) efeito das diferentes suplementações alimentares sobre parâmetros imunitários das células estudadas na presença de endotoxemia, a relação dos grupos estimulados entre si e com o basal.

6.2 Efeitos das diferentes suplementações alimentares sobre parâmetros imunitários de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais obtidos de ratos NÃO estimulados com LPS (Grupos C, R7,R14,N3,N6).

6.2.1 Fagocitose e Retenção de Vermelho Neutro.

No presente estudo, a atividade fagocitária de macrófagos peritoneais (FIGURA 10) e de neutrófilos sanguíneos (FIGURA 13) mediante estímulo com *zymosan* aumentou em todos os grupos suplementados em relação ao controle (C).

Os resultados referentes ao processo de fagocitose relatados na literatura apresentam conclusões variadas na dependência da inclusão no estudo de animais ou seres humanos, do animal empregado, da quantidade de óleo de peixe administrada, das diferentes proporções entre EPA e DHA ofertadas, do tempo de suplementação determinado e dos ensaios utilizados.

Dados produzidos no Laboratório de Metabolismo Celular da Universidade Federal do Paraná são condizentes com os apresentados neste trabalho. BONATTO *et al* (2004) relataram aumento da fagocitose, volume lisossomal, produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por neutrófilos sanguíneos de ratos saudáveis suplementados com óleo de peixe 1 g/kg por 69 dias, alterações também observadas por FOLADOR *et al* (2006) ao analisarem macrófagos peritoneais de roedores após suplementação com óleo de peixe.

Outros autores, com base em metodologias heterogêneas, principalmente no que se refere à dosagem de óleo de peixe empregada, reportaram resultados diversos em humanos. VIRELLA *et al* (1989), através da administração de 6 g/dia de óleo de peixe (equivalente a 2,1g/dia de EPA) durante 06 semanas a indivíduos saudáveis, relataram diminuição da fagocitose de neutrófilos sanguíneos ao final do estudo. Já HALVORSEN *et al* (1997) realizaram a suplementação de EPA (4g/dia), DHA (4g/dia) ou óleo de coco durante 7 semanas a pessoas saudáveis e evidenciaram a ausência de modificação da fagocitose por monócitos de bactéria não opsonizada, mas aumento da atividade fagocitária, principalmente relacionada ao EPA, em resposta à bactéria opsonizada. GORJÃO *et al* (2006) observaram aumento da capacidade fagocítica de neutrófilos e monócitos obtidos de homens saudáveis suplementados por 08 semanas com óleo de peixe 3g/dia (1,62g/dia DHA e 0,72 g/dia EPA) em resposta a *zymosan* opsonizado. Outras publicações sugerem a ausência de interferência da suplementação de óleo de peixe na fagocitose de leucócitos humanos de indivíduos previamente hígidos (HEALY *et al*, 2000; THIES *et al*, 2001).

A capacidade aumentada de fagocitose por neutrófilos sanguíneos (FIGURA 113) e macrófagos peritoneais (FIGURA 10) dos ratos alimentados com óleo de girassol (N6), óleo de peixe (N3) ou diferentes razões $\omega 6:\omega 3$ (R7 e R14) em relação à dieta padrão (C) encontrada neste trabalho pode ser explicada pela provável

incorporação dos AGPI suplementados nos fosfolipídeos de membrana e impacto na fluidez da membrana devido ao grau de insaturação de suas moléculas.

A fagocitose é desencadeada pela interação entre receptores e moléculas presentes na superfície da partícula a ser fagocitada, o que promove o remodelamento da membrana, extensão de pseudópodes e englobamento da partícula formando o fagossomo, cuja membrana é proveniente da membrana plasmática (YEUNG *et al*, 2006). Como o processo envolve diretamente a membrana celular, a atividade fagocítica se torna suscetível às alterações na fluidez da mesma, que, como referido anteriormente, é dependente de sua composição lipídica.

Assim como a fluidez da membrana, a otimização do processo de fagocitose relaciona-se diretamente com o grau de insaturação da molécula de ácido graxo e inversamente com a razão entre ácidos graxos saturados e insaturados (SCHROIT e GALLILY, 1979), o que foi comprovado por CALDER *et al* (1990) através da realização *in vitro* do cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes AGPI, entre eles ALA, ARA, LA, EPA e DHA, com posterior avaliação da fagocitose das células em resposta ao *zymosan*. Os resultados demonstraram que a fagocitose era tanto maior quanto maior a insaturação da molécula, exceto no que se refere às células cultivadas com EPA e DHA, as quais apresentaram atividade fagocítica menor que a esperada considerando as características de suas moléculas, porém mesmo assim maior que a relacionada a ácidos graxos saturados ou monoinsaturados. Isso talvez ocorra devido a diferenças entre os padrões de incorporação dos ácidos graxos polinsaturados administrados em relação às frações de fosfolipídeos (CALDER *et al*, 1994) e probabilidade de alteração da distribuição assimétrica dos mesmos na membrana celular conforme os ácidos graxos incorporados (KNAPP *et al*, 1994). Como os ácidos graxos contidos nos óleos utilizados para a preparação das rações ofertadas aos ratos são polinsaturados, a provável mudança na composição lipídica dos fosfolipídeos de membrana seria a responsável pela alteração na fluidez da mesma e consequente incremento da atividade fagocitária das células estudadas.

O fagossomo formado a partir da endocitose da partícula contém inicialmente em seu lúmen amostra de líquido extracelular, o qual se torna cada vez mais ácido conforme a aquisição das capacidades microbicidas e de remoção de células

apoptóticas, culminando na fusão com o lisossomo (YEUNG *et al*, 2006) e formação do fagolisossomo, onde a partícula ingerida será destruída.

O sistema lisossomal foi avaliado com base na incorporação de vermelho neutro às vesículas secretoras. Em relação aos macrófagos peritoneais (FIGURA 12) apenas o grupo R14 apresentou menor captação de vermelho neutro se comparado aos grupos R7, N3 e N6, enquanto em neutrófilos (FIGURA 16) a suplementação com óleo de girassol (N6) ocasionou aumento significativo em relação aos demais grupos.

Os estudos relacionados ao sistema lisossomal são escassos, mas resultados do Laboratório de Metabolismo Celular da Universidade Federal do Paraná indicam aumento do volume lisossomal após suplementação com óleo de peixe no basal (FOLADOR *et al*, 2006; BONATTO *et al*, 2004). Os resultados apresentados diferem destes provavelmente devido ao maior período de suplementação empregado (≥ 8 semanas) nestas publicações, o que pode ter interferido na incorporação dos ácidos graxos, resultando diferentes efeitos. Dois autores apresentam conclusões distintas no que se refere à incorporação dos ácidos graxos na membrana celular. HEALY *et al* (2000) verificaram platô de incorporação dos AGPI ω 3 após 04 semanas em neutrófilos humanos, já PALOZZA *et al* (1996) relataram o aumento progressivo da concentração de EPA e DHA em neutrófilos após 30 e 180 dias de administração de óleo de peixe a indivíduos saudáveis. A dose utilizada de óleo de peixe diferiu entre os dois trabalhos, sendo a dose empregada no último mais alta, o que pode ter impactado no resultado apresentado.

As diferenças entre os ensaios de retenção lisossomal de neutrófilos sanguíneos (FIGURA 16) e macrófagos peritoneais (FIGURA 12) possivelmente se devem às diferentes composições lipídicas de suas vesículas lisossomais ligadas às características funcionais de cada célula (MASON *et al* 1972). Enquanto houve diminuição da captação de vermelho neutro pelos macrófagos do grupo R14, houve aumento da capacidade por neutrófilos de ratos suplementados óleo de girassol. Tais resultados podem estar relacionados à preferência da célula à incorporação de determinado ácido graxo, à fração de fosfolípídeo aumentada ou diminuída após incorporação e sua distribuição na membrana, à alteração na razão entre colesterol e fosfolípídeo em decorrência da mudança do perfil lipídico da membrana lisossomal e à maior suscetibilidade à peroxidação lipídica do ácido graxo incorporado

(CALDER *et al*, 1994; KNAPP *et al*, 1994; MASON *et al*, 1972), todos fatores que potencialmente influenciam o padrão de resposta celular, sendo estas hipóteses a serem testadas futuramente.

6.2.2 Produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

Após a formação do fagolisossomo, são produzidas espécies reativas de oxigênio visando a eliminação da partícula ingerida (JANEWAY *et al*, 2002). Mesmo na ausência de estímulo, a produção de espécies reativas de oxigênio não é nula, sendo as fontes endógenas relacionadas à produção destas substâncias no organismo decorrentes da atividade de fagócitos e resultantes de processos metabólicos normais, como os relacionados à respiração celular, degradação de purinas e ácidos graxos, atividades enzimáticas envolvendo NADPH oxidase (SCHOENFELD e WOJTCZAK, 2008), ciclooxigenases, lipoxigenases e citocromo P450 (VICTOR *et al*, 2004; CIENCEWICKI *et al*, 2008). Em situações normais, não causam dano aos tecidos pois estão em equilíbrio com defesas antioxidantes, impedindo sua ação em superfícies celulares. Estas existem nos meios intracelular e extracelular, sendo representadas pela superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, vitaminas C e E (ácido ascórbico e α tocoferol respectivamente) e proteínas presentes no plasma como albumina, lactoferrina e ceruloplasmina (VICTOR *et al*, 2004).

No presente estudo, a administração de dieta com diferentes concentrações de AGPI ω 3 e ω 6 não ocasionou mudança na produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais no basal (FIGURA 11). Nos neutrófilos, a produção de ânion superóxido (FIGURA 14) aumentou nos grupos R14, N3 e N6 em relação aos grupos C e R7, enquanto a produção de peróxido de hidrogênio (FIGURA 15) se elevou nos grupos R7, R14 e N6 se comparados ao controle.

Estudos foram realizados visando esclarecer o papel dos AGPI presentes na membrana celular e a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células. Os resultados das publicações referentes à suplementação com diferentes AGPI e produção de EROS divergem provavelmente pelas mesmas razões citadas anteriormente. Os trabalhos que envolvem a administração de óleo de peixe são numerosos. THIES *et al* (2001), após suplementação de indivíduos saudáveis por 12

semanas com cápsulas contendo diferentes proporções entre AGPI, entre eles EPA, DHA, ALA, LA e ARA, não encontraram alteração no *burst* oxidativo por neutrófilos em resposta ao PMA entre os grupos analisados. No Laboratório de Metabolismo Celular da Universidade Federal do Paraná, os resultados referentes à produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e macrófagos demonstram aumento dessas substâncias após administração de óleo de peixe a ratos saudáveis, porém o período de suplementação geralmente definido nestes trabalhos (≥ 8 semanas) é maior que o utilizado neste estudo (FOLADOR *et al*, 2006, BONATTO *et al*, 2004). Em particular PIZATO *et al* (2006), em estudo relacionado ao impacto de diferentes suplementações alimentares em ratos portadores de tumor de Walker 256, encontraram aumento na produção de EROS por macrófagos peritoneais de ratos saudáveis suplementados com óleo de girassol, óleo de peixe e em diferentes razões $\omega 6/\omega 3$ em relação ao controle. Em relação aos AGPI $\omega 6$, as publicações relatam aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente no que se refere à presença de ácido araquidônico (LI *et al*, 1996; KHAN *et al*, 1995) na membrana celular.

A importância dos ácidos graxos reside na capacidade de modulação da síntese de EROS por vários mecanismos. Em condições normais, a cadeia respiratória mitocondrial e a atividade de células fagocíticas constituem as principais fontes de EROS (VICTOR *et al*, 2004). Normalmente o ânion superóxido formado no interior da mitocôndria é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio pela SOD ligada a manganês (Mn-SOD) ou no espaço intermembrana e citoplasma pela SOD associada a zinco e cobre (ZNCu-SOD). O peróxido de hidrogênio então é convertido a água e oxigênio através da ação da catalase ou reduzido a água e glutathione pela ação da glutathione peroxidase, o que proporciona a manutenção do estado redox da célula. Os ácidos graxos podem impedir a regeneração da glutathione peroxidase a partir de sua forma oxidada, prejudicando a retirada do peróxido de hidrogênio, o qual pode ser convertido a radicais halogenados. Além disso, os ácidos graxos podem interferir na produção mitocondrial de EROS através da inibição de complexos relacionados ao transporte de elétrons e ao promover o desacoplamento destes em relação à síntese de adenosina trifosfato (ATP) (SCHONFELD e WOJTCZAK, 2008).

Outro fator importante ligado à influência dos ácidos graxos na produção de EROS consiste nas alterações de membrana ocasionadas por estes. BADWEY (1984) relataram aumento da produção de ânion superóxido por neutrófilos não estimulados cultivados com AGPI na conformação *cis*, no caso ARA e LA. Na época ainda não havia explicação para o ocorrido. Hoje sabe-se que os ácidos graxos funcionam como mensageiros químicos, afetando as vias de sinalização intracelular através da interação com diversas proteínas celulares, entre elas fosfolipases, proteínas- G, canais iônicos e proteína quinases. No que se refere ao ARA, um de seus principais alvos é a proteínaquinase C (PKC), proteína da família das serina/treonina quinases ativada diretamente pelo ácido graxo e relacionada ao estímulo à catálise realizada pela enzima NADPH oxidase, a qual é responsável pela produção de ânion superóxido a partir do oxigênio molecular (KHAN *et al*, 1995).

A possibilidade de aumento da produção de espécies reativas de oxigênio desencadeada pela presença de ácidos graxos polinsaturados na membrana plasmática ou na membrana mitocondrial levou à consideração dos riscos relacionados à peroxidação lipídica. A lipoperoxidação compreende uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, podendo ocasionar destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e finalmente levando à morte celular (LIMA e ABDALLA, 2001). JENKINSON *et al* (1999) realizaram estudo que incluiu adultos saudáveis que ingeriram dieta com 5% ou 15% do total da gordura na forma de lipídeos insaturados. Segundo os autores, a razão $\omega 6/\omega 3$ manteve-se igual entre os grupos assim como a concentração das vitaminas C e E (<10mg/dia). Ao final, observaram aumento de lipoperóxidos urinários e aumento na concentração plasmática de glutathione oxidada na presença de dieta com 15% de gordura polinsaturada em comparação à dieta com 5%, demonstrando aumento da peroxidação lipídica em resposta à maior concentração de AGPI na dieta, alertando para a necessidade de aumento de antioxidantes na presença de maior consumo de gordura polinsaturada. As diferentes dietas utilizadas no presente estudo continham 20 % de gordura polinsaturada, porém todas elas apresentavam diferentes concentrações de antioxidantes. Em se tratando de humanos, a Organização Mundial da Saúde recomenda para adultos o consumo diário de 20 a 35% de gordura total, sendo 10 % gordura saturada, 6 a 11% de gordura polinsaturada e o

restante em gordura monoinsaturada. Em relação aos AGPI ω 3, a recomendação é de 0,5 a 2% do total de gordura polinsaturada e 0,250 a 2 g de EPA + DHA/dia (INTERIM SUMMARY OF CONCLUSIONS AND DIETARY RECOMMENDATIONS ON TOTAL FAT & FATTY ACIDS, 2008). As recomendações dietéticas diárias americanas para vitaminas e minerais incluem a ingestão de 9 a 12 mg de vitamina E, 39 a 65 mg de vitamina C e 35 a 45 μ g de selênio na dependência do sexo e idade de indivíduos acima de 9 anos (DIETARY REFERENCE INTAKES, 2011). Não é possível afirmar a presença ou ausência de lipoperoxidação neste trabalho, porém é útil o conhecimento de que os óleos adicionados à ração continham antioxidantes, minimizando o risco deste distúrbio.

Em resumo, as suplementações com óleo de girassol, óleo de peixe e em diferentes razões ω 6/ ω 3 ocasionaram aumento da atividade fagocitária de neutrófilos plasmáticos e macrófagos peritoneais obtidos de ratos saudáveis em comparação à dieta padrão. À alteração da fagocitose não se seguiram mudanças na retenção lisossomal pelas células, à exceção da diminuição da retenção de vermelho neutro por macrófagos do grupo R14 e do aumento da capacidade por neutrófilos sanguíneos do grupo N6, o que se deve provavelmente aos diferentes perfis de incorporação dos ácidos graxos na membrana lisossomal conforme relatado anteriormente. Em macrófagos peritoneais, a produção de ânion superóxido não se alterou, enquanto em neutrófilos houve elevação de sua produção nos grupos R14, N3 e N6 e aumento da produção de peróxido de hidrogênio nos grupos R7, R14, N6 se comparados ao controle. As diferenças entre as células estudadas provavelmente se devem às peculiaridades funcionais de cada uma delas.

6.3 Respostas à endotoxemia de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos alimentados com dieta padrão (Grupos C e CLPS).

A indução da endotoxemia provocou aumento das capacidades de macrófagos e neutrófilos provenientes de ratos alimentados com dieta padrão. A saber: fagocitose (FIGURAS 10 e 13), captação de vermelho neutro (FIGURAS 12 e

16), produção de ânion superóxido (FIGURAS 11 e 14) e peróxido de hidrogênio (FIGURA 15).

Os resultados obtidos são condizentes com os reportados na literatura tanto em roedores (VICTOR e De La FUENTE, 2003; DeLEO *et al*, 1998) como em humanos (MARTINS *et al*, 2003). Conforme relatado anteriormente, a interação da endotoxina bacteriana com o TLR4 presente na superfície dos macrófagos peritoneais promove a fagocitose do complexo antígeno/receptor, estímulo à formação de fagolisossomas, ativação de mecanismos microbicidas (CALDER, 2001) e indução à transcrição gênica de mediadores inflamatórios (STEARNS-KUROSAWA *et al*, 2011). Os neutrófilos sanguíneos coletados foram provavelmente ativados pela presença de LPS na corrente sanguínea juntamente com mediadores químicos produzidos pelos macrófagos ativados.

Os neutrófilos possuem o TLR4 (SABROE *et al*, 2003) e interagem com o LPS, porém a endotoxina torna o neutrófilo responsivo (*primed*), mas não ativado, como se nota no processo de produção de ânion superóxido em resposta a LPS e *N-formyl methionyl leucyl phenylalanine* (fMLP). Tal produção depende do complexo enzimático NADPH oxidase, o qual é constituído por duas subunidades de membrana, p22^{phox} e gp91^{phox}, ambas constituintes de uma flavo-heme-proteína denominada citocromo b₅₅₈; e três componentes citosólicos: p47^{phox}, p40^{phox} e p67^{phox} (BONATTO *et al*, 2005). O flavocitocromo b₅₅₈ encontra-se em grande parte (75-90%) na membrana de grânulos específicos, não na membrana plasmática celular. O estímulo a neutrófilos unicamente com LPS não promove a produção ânion superóxido, mas estimula o recrutamento do flavocitocromo b₅₅₈ para a membrana plasmática celular e favorece a junção dos demais componentes da NADPH oxidase na presença de fMLP, o que culmina na liberação da espécie reativa de oxigênio (De LEO *et al*, 1998).

Desse modo, a presença do LPS na corrente sanguínea teria tornado os neutrófilos responsivos, entretanto outros sinais foram necessários para ativá-los. Entre os mediadores químicos que podem ter influenciado a ativação de neutrófilos estão o LTB₄, TNF α , C5a, IFN γ , ARA, fator ativador de plaquetas (PAF) (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010; NATHAN, 1987) e o ânion superóxido, o qual, quando presente no meio extracelular, amplifica a resposta inflamatória desencadeada pelas células do sistema imune inato ao favorecer a migração do

NF κ B ao núcleo com posterior transcrição gênica de TNF α e fator inibidor de macrófagos 2 (MIP2) em neutrófilos (LORNE *et al*, 2007).

As funções relacionadas à atividade fagocitária, produção de espécies reativas de oxigênio e captação de vermelho neutro por neutrófilos se mostraram mais estimuladas se comparadas às apresentadas pelos macrófagos. Isso se deve provavelmente ao tempo determinado para coleta das células no estudo (3 horas) em relação à ativação das mesmas. O início da resposta imunológica requer inicialmente a ativação dos macrófagos residentes, no caso os macrófagos peritoneais, cujas atividades exibem um padrão temporal em resposta ao estímulo. VÍCTOR *et al* (1998) observaram que a resposta de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos à endotoxina bacteriana administrada por via ip era tempo-dependente, com picos de atividade fagocitária e aderência à superfície plástica após 02 horas da administração do LPS, o que se correlacionou com a maior concentração de TNF α produzido pelas células em cultivo. Os neutrófilos sanguíneos foram provavelmente ativados após os macrófagos peritoneais. Tais células demandam mais tempo para resposta, como evidenciado por NATHAN (1987) ao avaliar a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos aderidos ao endotélio em resposta a TNF α *in vitro*, observando atraso de 15 a 90 minutos para a elevação da espécie reativa de oxigênio após o estímulo com a citocina. Desse modo, a própria distância do estímulo e as características celulares provavelmente provocaram as diferentes magnitudes de resposta entre as células estudadas.

6.4 Respostas à endotoxemia de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos, sua relação com o basal e com as diferentes suplementações alimentares ofertadas aos ratos.

Como relatado anteriormente, as mudanças ocorridas na dieta ocidental associam-se ao aumento da incidência de doenças caracterizadas por inflamação. Estas referem-se ao aumento do consumo de gordura saturada aliada ao desequilíbrio entre AGPI ω 6 e ω 3, sendo a razão atual entre esses ácidos graxos igual a 15 a 25:1 enquanto a de nossos ancestrais era de 1:1 (SIMOPOULOS, 1999a; EATON e KONNER, 1985).

Este estudo visou investigar o impacto de diferentes concentrações de AGPI nas rações administradas sobre a atividade de células ligadas à inflamação inicialmente induzida em casos de endotoxemia, considerando a razão $\omega 6 : \omega 3$ 7:1 mais próxima daquela consumida por nossos ancestrais e a 14:1 similar à presente na dieta ocidental.

No presente trabalho, as alterações celulares ocasionadas pela maior concentração de AGPI $\omega 3$ na dieta dos ratos, em particular nos grupos N3-R7-LPS estimulados, referem-se à capacidade de atenuação da resposta inflamatória por esses AGPI no que se refere à fagocitose, captação de vermelho neutro e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos *in vivo* após estímulo com LPS em especial numa razão $\omega 6 : \omega 3$ que diverge da presente na dieta ocidental.

As considerações que se seguem têm por base o processo fisiopatológico da endotoxemia descrito anteriormente e a exploração dos mecanismos anti-inflamatórios dos AGPI $\omega 3$ em detrimento das ações dos AGPI $\omega 6$ sobre as células estudadas e a comunicação entre elas.

Os macrófagos peritoneais são células portadoras de TLR4 e uma das primeiras células a entrar em contato com a endotoxina (STEARNS-KUROSAWA, 2010). Como exposto anteriormente, macrófagos estimulados de ratos alimentados com dieta padrão (CLPS) apresentaram aumento de suas capacidades aqui representadas como fagocitose, retenção lisossomal e produção de ânion superóxido, o que demonstra que macrófagos residentes tornaram-se predominantemente ativados classicamente, o que é compatível com a resposta celular inicial induzida pela endotoxemia (VÍCTOR *et al*, 2003; DeLEO *et al*, 1998; MARTINS *et al*, 2003). As presenças de óleo de peixe, seja ele isoladamente (N3LPS) ou nas proporções AGPI $\omega 6 : \omega 3$ 7:1 (R7LPS) e 14:1 (R14LPS), e de óleo de girassol (N6LPS) inibiram o incremento à atividade fagocitária de macrófagos estimulados por LPS em resposta a *zymosan* se comparadas ao basal (N3,R7,R14,N6). A inibição ao aumento da fagocitose pelos macrófagos peritoneais estimulados não se seguiu redução equivalente na retenção de vermelho neutro pelas células. Pelo contrário, a presença da endotoxemia resultou elevação da captação de vermelho neutro pelas células em todos os grupos estimulados em relação ao basal (FIGURA 12), fato este importante pois denota a manutenção da

capacidade de combate ao agente agressor a despeito da ausência de incremento da fagocitose pelas células dos grupos suplementados. À formação das vesículas fagolisossômicas segue-se a ativação de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio (JANEWAY *et al*, 2002), sendo a produção de ânion superóxido o primeiro passo na formação de espécies reativas de oxigênio (BEUTLER, 2004). A suplementação com óleo de peixe (N3LPS) e na razão $\omega 6:\omega 3$ 7:1 (R7LPS) inibiu a elevação de ânion superóxido produzido por macrófagos após o estímulo com LPS *in vivo*. Pela maior presença de AGPI $\omega 6$ no grupo R14LPS, seria esperado também o aumento no grupo N6LPS, fato este não observado provavelmente pelas células no basal (N6) já apresentarem produção 11,4% maior que as do grupo R14, embora tal diferença não tenha atingido significância estatística.

A ativação clássica dos macrófagos provavelmente ocorreu pela presença de IFN γ aliada à ligação da endotoxina bacteriana a seu receptor na superfície celular, o TLR4. A fonte de IFN γ se deve possivelmente à presença de células NK no local da lesão, ou seja, na cavidade abdominal dos ratos. HALLER *et al* (2000) demonstraram *in vitro* a ativação das células NK na presença de *Escherichia coli* no meio de cultura e observou que a produção de IFN γ pelas mesmas é dependente do contato com macrófagos que se tornaram responsivos (*primed*), não ativados, pelo contato com a bactéria, demonstrando que o IFN γ não é necessariamente o primeiro sinal responsável pela ativação de macrófagos, mas pode agir como o segundo e este pode ser proveniente das células NK.

Se as células NK produzem o IFN γ necessário para a ativação dos macrófagos, um dos mecanismos pelo qual o óleo de peixe (N3LPS) e a suplementação com maior quantidade de AGPI $\omega 3$ (R7LPS) pode ter ocasionado os efeitos nas capacidades de macrófagos observados pode ser atribuído à uma menor ativação celular devido à depressão da atividade das células NK ocasionada por estes ácidos graxos, com diminuição conseqüente da produção de IFN γ (MUKARO *et al*, 2008).

Para ativação celular na endotoxemia, não somente a interação com o IFN γ é importante, mas também a interação com o TLR4, momento em que também ocorre a influência dos AGPI $\omega 3$. WONG *et al* (2009) realizou experimento *in vitro* com

macrófagos e observou que as cascatas de sinalização que se seguem ao LPS dependem da presença dos *lipid rafts*, não ocorrendo na ausência destes.

O LPS induz o recrutamento do TLR4 e suas moléculas acessórias como MYD88 aos *lipid rafts*, promove a associação do TLR4 com a molécula MD2 e favorece a dimerização do receptor, o que é essencial à atividade do mesmo. A interação do LPS com o TLR4 depende em parte da produção de espécies reativas de oxigênio derivadas da ação da NADPH oxidase, já que a inibição da ativação desta enzima após estímulo com LPS por substâncias como *N- acetilcisteína* suprime a dimerização do TLR4 assim como sua translocação aos *lipid rafts* (WONG *et al*, 2009).

A essencialidade da presença dos *lipid rafts* para a ação do LPS sobre as células juntamente com a composição rica em ácidos graxos saturados característica desses microdomínios celulares implicou na curiosidade sobre as ações dos AGPI $\omega 3$ sobre a sinalização induzida pela endotoxina bacteriana. Existem na literatura publicações que demonstram a alteração na composição lipídica da membrana celular e consequente deslocamento das proteínas contidas nos *lipid rafts* na presença de AGPI $\omega 3$ (CALDER e YAQOOB, 2007; STULNIG *et al*, 2001), o que se relaciona às alterações desencadeadas por esses ácidos graxos, particularmente pelo DHA, na interação entre LPS e TLR4.

O DHA antagoniza os efeitos ocasionados pelo LPS por diversos mecanismos: diminuição da translocação do TLR4 presente no citoplasma das células em repouso para os microdomínios após estimulação, supressão da dimerização do receptor e inibição do recrutamento de moléculas vinculadas ao TLR4, como MYD88, aos *lipid rafts* (WONG *et al*, 2009). O prejuízo à interação do LPS com o TLR4 proporcionado pelo DHA culmina na inibição do NF κ B (STULNIG *et al*, 2001), na diminuição da expressão de moléculas co- estimuladoras CD86, CD80 e na produção de IL12 e IL6 por células dendríticas (WONG *et al*, 2009; WEATHERILL *et al*, 2005). Se o raciocínio for estendido aos macrófagos, a menor produção de IL12 poderia reduzir a razão IL12/IL10 e a menor proporção entre essas citocinas caracteriza a atividade de macrófagos regulatórios, os quais visam a resolução da inflamação (VÍCTOR *et al*, 2004).

Considerando a resposta comum do hospedeiro ao patógeno, os genes envolvidos na resposta à endotoxemia incluem aqueles relacionados a fatores de

transcrição e componentes das vias de transdução de sinais que podem mediar o início da inflamação e promover a transcrição de genes específicos (JENNER e YOUNG, 2005). Ao interferir na interação entre LPS e TLR4, os AGPI ω 3 inibem a ativação do fator de transcrição NF κ B, o que acarreta diminuição da secreção pelas células inflamatórias de TNF α (CHANDRASEKAR e FERNANDES, 1994; SADEGUI *et al*, 1999), IL8 (VEDIN *et al*, 2008), IL6 (CHANDRASEKAR e FERNANDES, 1994; VEDIN *et al*, 2008; SADEGUI *et al*, 1999), IL1 β (VEDIN *et al*, 2008; SADEGUI *et al*, 2008) e fator estimulador de colônia de granulócitos (GMCSF) (VEDIN *et al*, 2008), os quais potencialmente influenciam a ativação de neutrófilos (MANTOVANI *et al*, 2011; NATHAN, 1987; LI *et al*, 1996, WITTHAUT *et al*, 1994.).

A inibição do NF κ B por sua vez parece estar relacionada à ativação de PPAR α por EPA oxidado (MISHRA *et al*, 2004). Há evidência de que EPA e DHA sofrem rapidamente auto-oxidação (CHO *et al*, 1987). A oxidação de EPA leva à geração de mistura de aldeídos, peróxidos e outros produtos que talvez sejam responsáveis pelos efeitos anti- inflamatórios proporcionados pelo AGPI. Durante inflamação provavelmente há maior oxidação dos AGPI ω 3 devido ao estresse oxidativo e à expressão das enzimas COX e LOX, as quais oxidam AGPI (MISHRA *et al*, 2004). Da reação entre fosfolipídeos da membrana e essas enzimas resultam eicosanóides e docosanóides que atuam como mediadores químicos. Os PPARs funcionam como sensores de lipídeos, executando suas atividades após o contato com ligantes endógenos provenientes do metabolismo dos ácidos graxos. PPAR α é responsável pela captura de ácidos graxos com posterior oxidação dos mesmos e também de seus metabólitos (GANI, 2008), o que possivelmente justifica a relação entre PPAR α , EPA oxidado e inibição da ativação de NF κ B. Desse modo, os resultados obtidos com a suplementação de óleo de peixe e na razão ω 6: ω 3 7:1 após estímulo com LPS podem ser justificados pela ação dos AGPI ω 3 como agonistas de PPARs, em particular PPAR α .

A provável diminuição na produção de citocinas, como TNF α , INF γ , GMCSF e quimiocinas, como IL8, aliada à diminuição de LTB4 e menor produção de EROS pelos macrófagos ativados na presença de maior concentração de EPA e DHA (grupos N3LPS e R7LPS) pode ter influenciado a atividade dos neutrófilos sanguíneos, provocando menor ativação dos mesmos. A importância do TNF α para a ativação de neutrófilos foi verificada por WITTHAUT *et al* (1994) através de

estímulo a neutrófilos humanos com plasma de ratos endotoxêmicos *in vitro*. Observaram que a ativação de neutrófilos era dependente de estímulo com TNF α e complemento e que estas substâncias promoviam o aumento da expressão da integrina CD11b/CD18, a qual media a migração transendotelial de neutrófilos e é considerada marcador de ativação destas células.

Além das possíveis alterações na comunicação celular, os neutrófilos também possuem TLR4 (SABROE *et al*, 2003), sendo as considerações realizadas sobre as influências do DHA sobre a interação LPS/receptor em macrófagos provavelmente aplicáveis a neutrófilos, o que contribuiria para a menor ativação destas células em resposta à endotoxemia.

Desse modo, a justificativa inicial relacionada ao impacto da suplementação com óleo de peixe e nas razões $\omega 6:\omega 3$ 14:1 e 7:1 sobre a fagocitose de zymosan assim como a supressão à produção de ânion superóxido por macrófagos estimulados com LPS e obtidos de ratos suplementados com óleo de peixe ou na razão $\omega 6:\omega 3$ 7:1 pode ser atribuída ao prejuízo à interação ligante/receptor na presença de DHA assim como à menor presença de IFN γ produzido por células NK, o que favorece a menor ativação clássica de tais células, podendo talvez relacionar-se à indução de macrófagos regulatórios. Os neutrófilos, ativados posteriormente, apresentaram alterações similares aos macrófagos no que tange ao efeito dos AGPI $\omega 3$ nas atividades celulares estudadas provavelmente em decorrência da alteração na comunicação intercelular assim como da menor interação do LPS com o TLR4 presente na superfície destas células.

Neutrófilos estimulados com LPS apresentaram ausência de incremento na capacidade fagocítica quando obtidos de ratos suplementados com óleo de peixe (N3LPS) ou na razão 7:1 (R7LPS), divergindo do efeito estimulador à fagocitose promovido pela suplementação na razão $\omega 6:\omega 3$ 14:1 (R14LPS) e rica em óleo de girassol (N6LPS). A essa alteração não se seguiu redução da captação de vermelho neutro, pelo contrário, as células dos grupos R7LPS e N3LPS apresentaram aumento de tal capacidade em relação ao basal, o que não foi verificado nos grupos R14LPS e N6LPS, cujos aumentos não foram significativos se relacionados ao basal provavelmente devido à maior capacidade das células no estado não estimulado. Ou seja, as suplementações com óleo de peixe e na razão $\omega 6:\omega 3$ 7:1 ocasionaram ausência de elevação da capacidade fagocítica de neutrófilos sanguíneos em

resposta ao LPS e concomitante aumento na captação de vermelho neutro por tais células, o que implica na provável manutenção da atividade microbicida celular.

A presença de óleo de peixe, seja ele isoladamente ou nas razões $\omega 6:\omega 3$ 7:1 ou 14:1, inibiu o incremento de ânion superóxido pelos neutrófilos estimulados, sendo interessante notar que a produção nos grupos R7LPS e N3LPS foi significativamente menor que a verificada no grupo R14LPS. Quanto ao peróxido de hidrogênio, no grupo R7LPS não houve incremento à produção desta substância e no N3LPS houve elevação em relação ao basal, porém as produções verificadas nestes grupos foram significativamente menores que as observadas nos grupos R14LPS e N6LPS. Em resumo, as suplementações com óleo de peixe e na razão $\omega 6:\omega 3$ 7:1 têm potencial de reduzir a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em comparação às com óleo de girassol e na razão $\omega 6:\omega 3$ 14:1, promovendo menor estímulo à secreção destas substâncias na presença de endotoxemia.

No que concerne a ativação das células, não é possível afirmar a ausência de ativação celular com base nos resultados apresentados já que o TLR4 não é o único receptor pelo qual o LPS interage com as células do sistema imune inato (COHEN, 2002; TAKEDA e AKIRA, 2004; IMLER e HOFFMAN, 2001). Porém, os efeitos dos AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ não se restringem ao processo de ativação celular, mas podem afetar as capacidades de células previamente ativadas, mesmo que em menor grau, como exposto a seguir.

No que se refere às espécies reativas de oxigênio, as diferenças entre AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ são importantes. O ARA, um AGPI $\omega 6$, promove a ativação direta da PKC (KHAN *et al*, 1995), enzima relacionada à ativação da NADPH oxidase, enquanto os AGPI $\omega 3$ inibem tal proteína quinase, o que parece estar relacionado à posição da dupla ligação que denomina esses ácidos graxos, ou seja, no terceiro carbono a partir do grupo metil terminal (MIRNIKJOO *et al*, 2001). MASSARO *et al* (2006), em estudo visando avaliar a expressão de COX2 por células endoteliais na presença de DHA *in vitro* demonstraram que a presença deste AGPI resultou na inibição da expressão gênica da COX 2 em resposta à IL1 α , fato este relacionado à inibição de NF κ B, de MAPK e diminuição na produção de EROS, redução atribuída à menor translocação à membrana de subtipo determinado de PKC (PKC ϵ) e da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase na presença de DHA.

Além disso, a suplementação com óleo de peixe potencialmente diminui a concentração de EROS pelo aumento da transcrição gênica de catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, fato este observado no tecido renal de camundongos em modelo experimental de nefrite associada a lúpus eritematoso, onde também foi observado o efeito contrário ocasionado pela administração de óleo de milho, rico em AGPI ω 6, a qual provocou a diminuição desses antioxidantes endógenos (CHANDRASEKAR e FERNANDES, 1994).

No que diz respeito à fagocitose, a ativação de receptores nas células fagocíticas desencadeia uma série de eventos que ligam a superfície celular às respostas produzidas por estas células. A fagocitose é um processo associado ao acúmulo de 1,4,5 inositol trifosfato (Ins[1,4,5]P₃) e 1,2 diacilglicerol (1,2 DAG). O primeiro ocasiona a mobilização de cálcio intracelular e 1,2 DAG é um segundo mensageiro que ativa a PKC. O processo de fagocitose pode ocorrer independentemente da presença de cálcio, demonstrando que a ação de 1,2 DAG parece mais importante que a ação do Ins[1,4,5]P₃ para a endocitose da partícula e formação do fagossoma. Já a fusão com o lisossomo é dependente de cálcio e não ocorre na ausência deste íon (JACONI *et al*, 1990).

Talvez as dependências de 1,2 DAG para ocorrência da fagocitose e de Ins[1,4,5]P₃ para a fusão do fagossomo com o lisossomo possam justificar as diferenças observadas neste estudo em relação à fagocitose e retenção de vermelho neutro pelas células estudadas. Em macrófagos estimulados, à inibição da atividade fagocitária nos grupos R7LPS, R14LPS e N3LPS em relação ao basal (FIGURA 8) não se seguiu a redução do volume lisossomal (FIGURA 10) e em neutrófilos, enquanto o estímulo com LPS não ocasionou incremento da fagocitose em relação ao basal nos grupos R7LPS e N3LPS (FIGURA 11), acarretou aumento da retenção de vermelho neutro nos mesmos grupos (FIGURA 14). Como 1,2 DAG se relaciona à ativação da PKC, a qual pode ser inibida por AGPI ω 3, é provável que os efeitos desses AGPI sobre a capacidade fagocitária sejam diferentes daqueles relacionados à formação do fagolisossomo, o qual é dependente principalmente da mobilização de cálcio induzida pela ação de Ins[1,4,5]P₃.

Curiosos são os resultados divergentes referentes à fagocitose de *zymosan* no basal e após estímulo com LPS pelas células estudadas. Observamos aumento da fagocitose induzida por *zymosan* por macrófagos peritoneais e neutrófilos

sanguíneos não estimulados em todos os grupos suplementados no basal (FIGURAS 10 e 13), fato este provavelmente relacionado à alterações de membrana. Entretanto, na presença de estímulo com LPS, o aumento da fagocitose induzida por *zymosan* em macrófagos (FIGURA 10) foi inibido em qualquer um dos grupos que continham óleo de peixe (R7LPS, R14LPS e N3LPS) e, em neutrófilos estimulados (FIGURA 13), a maior proporção de óleo de peixe (R7LPS) assim como sua suplementação exclusiva na dieta (N3LPS) não acarretaram incremento adicional da referida capacidade, tendendo inclusive a decréscimo no grupo N3LPS, ao contrário do ocasionado pela administração da ração na razão 14:1 (R14LPS), a qual aumentou de modo significativo o processo se comparado ao basal (R14).

Os diferentes efeitos na capacidade fagocítica relacionados à administração de óleo de peixe entre as células no basal e após estímulo com LPS possivelmente estão relacionadas à presença da endotoxina, às características peculiares de cada célula em distintos estados de ativação e aos AGPI em diferentes condições. Além disso, no basal há apenas estímulo ao TLR2, sendo este mediado pelo *zymosan* (VOLMAN *et al*, 2005), enquanto na presença de LPS, o TLR4 pode ser ativado de modo adicional pela endotoxina, o que talvez influencie as respostas da células na presença de AGPI, hipótese não testada neste estudo.

De acordo com os resultados apresentados, os AGPI $\omega 3$ atenuam a resposta inflamatória em particular quando a suplementação alimentar é realizada com óleo de peixe ou na razão $\omega 6:\omega 3$ 7:1 ao considerar as capacidades de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos estimulados por LPS *in vivo*. A retenção de vermelho neutro pelas células estudadas não foi inibida ou diminuída na presença das suplementações citadas, o que, conforme relatado anteriormente, talvez seja devido aos mecanismos distintos de sinalização celular envolvidos nos processos de fagocitose e fusão com o lisossomo e suas relações com AGPI.

No presente estudo, não é possível afirmar o benefício da modulação proporcionada pelos AGPI $\omega 3$ nas concentrações utilizadas, já que não foi realizado análise do impacto das suplementações no desfecho da endotoxemia induzida nos ratos, porém, há evidência que sugere que o balanceamento entre os ácidos graxos polinsaturados acarreta benefícios. BROUGHTON *et al* (1997) estudaram os efeitos do consumo de ácidos graxos nas razões $\omega 6/\omega 3$ de 10:1 e 2:1 (0,7g e 3,3g/dia EPA

+ DHA respectivamente) entre asmáticos por 04 semanas. Os resultados revelaram que o consumo da razão 10:1 relaciona-se com a piora dos sintomas respiratórios em resposta à metacolina, enquanto a relação 2:1 acarretou melhora em mais de 40 % dos pacientes incluídos no estudo. A relação 2:1 acarretou melhor relação entre LTs das séries 5 e 4, o que foi considerado uma possível explicação para o benefício encontrado com a razão $\omega 6:\omega 3$ 2:1.

Os estudos relacionados a sepse e AGPI $\omega 3$ são realizados em grande parte em doentes críticos que necessitam de dieta especializada. Houve grande mudança no perfil lipídico das emulsões lipídicas utilizadas para composição da nutrição parenteral. Inicialmente foram utilizadas emulsões lipídicas baseadas em óleo de soja, cujos efeitos se apresentaram prejudiciais devido provavelmente ao desequilíbrio entre AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$, o que acarretou a inclusão dos AGPI $\omega 3$ nas formulações lipídicas e a busca pela melhor relação entre eles, sendo as razões $\omega 6:\omega 3$ 4:1 a 2:1 consideradas benéficas a pacientes com risco de desenvolvimento de SIRS (GRIMBLE, 2005). Considerando o potencial anti-inflamatório dos AGPI $\omega 3$, BARBOSA *et al* (2010) estudaram o efeito da administração parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 05 dias a pacientes sépticos. Uma delas contendo triglicerídeos de cadeia média (TCM) e óleo de soja e a outra com oferta de óleo de soja e TCM acrescidos de 6,4 g/d de óleo de peixe, equivalente a 2,3 g/d EPA e DHA/dia. Ao final do estudo, houve queda mais pronunciada das concentrações séricas de IL6, IL1 β e TNF α e menor na de IL10 além de melhora na troca gasosa e diminuição do tempo de permanência hospitalar nos pacientes que receberam nutrição parenteral contendo óleo de peixe.

7 CONCLUSÃO:

Os resultados apresentados sugerem que as suplementações alimentares com óleo de peixe ou na razão $\omega 6:\omega 3$ de 7:1 foram capazes de atenuar a resposta inflamatória inicialmente induzida na presença de endotoxemia bacteriana em ratos ao atuar sobre os parâmetros imunitários de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos analisados neste trabalho. Considerando os dados obtidos, outros estudos são necessários visando esclarecer o impacto das diferentes suplementações alimentares utilizadas sobre a morbi-mortalidade ocasionada pela endotoxemia induzida em ratos, hipótese esta não testada no presente trabalho.

8 BIBLIOGRAFIA:

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6^a.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
2. ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v.40, n.9, p. 1707-1712, 1994.
3. ALVES- FILHO, J.C.; SPILLER, F.; CUNHA, F.Q. Neutrophils paralysis in sepsis. **Shock**, Publish Ahead of Print, 2010.
4. ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v.2, p. 283-318, 1984.
5. AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll- like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 499-511, julho 2004.
6. ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v.21, n.7, p. 1303-1310. 2001.
7. BADWEY, J.A.; CURNUTTE, J.T.; ROBINSON, J.M.; BERDE, C.B.; KARNOVSKY, M.J.; KARNOVSKY, M.L. Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. Reversibility by albumin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.12, p. 7870-7877, 1984.
8. BARBOSA, V.M.; MILES, E.A.; CALHAU, C.; La FUENTE, E.; CALDER, P.C. Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial. **Critical Care**, v.14: R5, p. 1-11, 2010.

9. BENJAMIN, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Simpósio: Medicina Intensiva- 3ª. Parte, capítulo II**, v. 34, p. 18-26. Ribeirão Preto, 2001.

10. BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. **The Journal of Immunology**, v.166, p. 6861-6868, 2008.

11. BERNARD, C.; MERVAL, R.; ESPOSITO, B.; TEDGUI, A. Resistance to endotoxin shock in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.31, p.1350-1356, 1998.

12. BIMBAUM, J.; STUEBS, P.; LORENZ, B.; SPIES, C.D.; KLOTZ, E.; HEIN, O.V.; GRUNDLING, M.; PAVLOVIC, D.; USICHENKO, T.; WENDT, M.; KOX, W.J.; LEHMANN, C. Effects of dopexamine on the intestinal microvascular blood flow and leucocyte activation in a sepsis model in rats. **Critical Care**, vol 10, n.4, R117, 2006

13. BONATTO, S.J.R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H.H.P.; VECCHIA, R.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v. 231, p.56-62, 2004.

14. BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA F.B.; DELLINGER, A.M.F.; KNAUS W.A.; SCHEIN, R.R.M.; SIBBALD, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *The ACCP/SCCM Consensus Conference Comitee*. **Chest**, vol 101, p.1644-1650, 1992.

15. BEUTLER, B.; POLTORAK, A.; XIAOLOG, H.; SMIRNOVA, I.; MU-YA, L.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI- CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B. Defective LPS signalling C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085-2088, dezembro 1998.

16. BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E.Th. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 169-176. 2003.

17. BEUTLER, B. Innate Immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845-859, 2004.

18. BOUDREAU, M.D.; CHANMUGAM, P.S.; HART, S.B.; LEE, S.H.; HWANG, D.H. Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p.11-117, 1991.

19. BONATTO, S.J.R. **Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário de pacientes, pós- remoção tumoral e efeito *in vitro* do óleo de peixe sobre as células tumorais.** 114 fl. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

20. BONE, R.C. Immunologic Dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n.15, p. 680-687, 1996.

21. BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, vol 33, p. 657-670, novembro 2010.

22. BROUGHTON, K.S.; JOHNSON, C.S.; PACE, B.K.; LIEBMAN, M.; KLEPPINGER, K.M. Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, n.4, p. 1011-1017, 1997.

23. BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.5, suppl. 5, p.9-15, 1976.
24. CINEL, I.; OPAL, S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical Care Medicine**, v. 37, n.1, p.291-304, 2009.
25. CALDER, P.C.; BOND, J.; HARVEY, D.J.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochemical Journal**, v. 269, p. 807-814, 1990.
26. CALDER, P.C.; YAQOOB, P.; HARVEY, D.J.; WATTS, A.; NEWSHOLME, E.A. Incorporation of fatty acids by concanavalin A- stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. **Biochemical Journal**, v.300, p. 509-518, 1994.
27. CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v.36, P. 1007- 1024, setembro 2001.
28. CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. **Lipids**, v. 38, p. 343-352, 2003.
29. CALDER, P.C; YAQOOB, P. Lipid Rafts- Composition, characterization and controversies. **Journal of Nutrition**, v.137, p.545-547, 2007.
30. Cell Membranes. **Scitable by Nature Education**, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-membranes-14052567>. Acesso em 20 de dezembro de 2011.
31. CHANDRASEKAR, B.; FERNANDES, G. Decreased pro-inflammatory cytokines and increases antioxidant enzyme gene expression by ω 3 lipids in murine lupus nephritis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.200, n.2, p. 893-898, 1994.

32. CHO, SY; MIYASHITA, K.; MIYAZAWA, T.; FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Autooxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, v.64, n.6, p. 876-879, 1987.
33. CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEGERGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.122, p. 456-468, 2008.
34. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-891, 19/26 dezembro 2002.
35. CHRISTIE, W.W. Fatty acids: methylene-interrupted double bonds - structures, occurrence and biochemistry. **Lipid library**, Escócia, 2011. Disponível em http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/fa_poly/file.pdf. Acesso em 14 de dezembro de 2011.
36. DAS, U.N. Essential Fatty Acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnology Journal**, v.1, p. 420-439, 2006.
37. DeLEO, F.R.; RENEE, J.; McCORMICK, S.; NAKAMURA, M.; APICELLA, M.; WEISS, J.P.; NAUSEEF, W.M. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n.2, p.455-463,1998.
38. Dietary Reference Intakes (DRIs): Estimated Average Requirements. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. **United States Department of Agriculture**, Beltsville, Estados Unidos, 2011. Disponível em <http://fnic.nal.usda.gov>. Acesso em 01 de dezembro de 2011.
39. DUENAS, D.T. **Papel do peroxinitrito na migração de neutrófilos para o foco infeccioso e na disfunção cardiovascular durante a sepsis grave**. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006

40. EATON, S.B.; KONNER, M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 283-292, 1985.

41. FOLADOR, A.; HIRABARA, S.; BONATTO, S.J.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **International Journal of Cancer**, v.120, p. 344-350, 2006.

42. FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, p. 497-509, 1957.

43. FROTKIS, I.; KLEIN, Y.; LOCKER, C.; NIMROD, A.; DAHAN, E.; URETZSKY, G.; SHAPIRA, I.; SORKINE, P. Vipera aspis venom reduces lethality and down-regulates tumor necrosis factor- α a rat model of LPS-induced sepsis. **Cytokine**, v. 49, p 319-324, 2010.

44. FUZISSAKI, C.N. **Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação**. 33 fl. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

45. GALLI, C.; CALDER, P.C. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.55, p.123-139, 2009.

46. GALLI, S.J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T.A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nature Immunology**, v. 12, n.11, p. 1035-1044, 2011.

47. GANI, O. Are fish oil omega-3 long-chain fatty acids and their derivatives peroxisome proliferator- activated receptor agonists? **Cardiovascular Diabetology**, 7:6, p. 1-6, 2008.

48. GERBER, J.S.; MOSSER, D.M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc γ receptors. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 6861-6868, 2001.

49. GIBNEY, M.J.; HUNTER, B. The effects of short- and long -term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n 4, p. 255-259, 1993.

50. GOGUS, U.; SMITH, C. n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 417-436, 2010.

51. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p. 23-35, janeiro 2003.

52. GORJÃO, R.; VERLENGIA, R.; de LIMA, T.M.; SORIANO, F.G.; BOAVENTURA, M.F.C.; KANUNFRED, C.C.; PERESA, C.M.; SAMPAIO, S.C.; OTTON, R.; FOLADOR, A.; MARTINS, E.F.; CURI, T.C.P.; PORTIOLLI, E.P.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. **Clinical Nutrition**, v.25, p. 923-938, 2006.

53. GRIMBLE, R. Fatty acids profile of modern lipid emulsions: Scientific considerations for creating the ideal composition. **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, p. 9-15, 2005

54. GUIMARÃES, A.R.P. **Influência das dietas ricas em ácidos graxos polinsaturados e saturados sobre o sistema imunológico- Estudo do metabolismo e funcionalidade de linfócitos e macrófagos**. 150 fl. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

55. HALL, M.J.; WILLIAMS,S.N.; DeFRANCES, C.J.; GOLOSINSKIY, A. Inpatient Care for Septicemia or Sepsis: A Challenge for Patients and Hospitals. Hyattsville, MD: **NCHS data brief**, no 62, National Center for Health Statistics, 2011, 8 P. Relatório Técnico.

56. HALLER, D.; BLUM, S.; BODE, C.; HAMMES, W.P.; SCHIFFRIN, E.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. **Infection and Immunity**, v.68, n.2, p. 752, 2000.

57. HALVORSEN, D.S.; HANSEN, JB.; GRIMSGARD, S.; BONAAB, K.H.; KIERULF, P.; NORD, A. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. **Lipids**, v. 32, p. 935–942, 1997.

58. HEALY, D.A.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C.; NEWSHOLME, P. Effect of low- to- moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. **Lipids**, V.35, P. 763-768, 2000.

59. HEIDEMANN, S.M.; GLIBETIC, M. Comparison of the systemic and pulmonary inflammatory response to endotoxin of neutropenic and non-neutropenic rats. **Journal of Inflammation**, 4:7, 2007.

60. HOFFMAN, J.A.; LEMAITRE, B.; NICOLAS, E., MICHAUT, L.; REICHHART, JM. The dorsoventral regulatory gene cassette *spa`tzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. **Cell**, v. 86, p. 973-983, setembro 1996.

61. HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n. 2, p. 138-150, janeiro 2003.

62. HURLEY, J.C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 268-292, abril 1995.

63. IBA, T.; MIYASHO, T. Danaparoid sodium attenuates the increase in inflammatory cytokines and preserves organ function in endotoxemic rats. **Critical Care**, v. 12, n.4, R86, 2008.

64. IBA, T.; NAKARAI, E.; TAKAYAMA, T.; NAKAJIMA, K.; SASAOKA, T.; OHNO, Y. Combination effect of antithrombin and recombinant human soluble thrombomodulin in a lipopolysaccharide induced rat sepsis model. **Critical Care**, v. 13, R203, 2009.

65. IMLER, J.L.; HOFFMANN, J.A. Toll receptors in innate immunity. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 304-311, julho 2001.

66. Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids. From the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. **World Health Organization**, Genebra, Suíça, 2008. Disponível em http://www.who.int/nutrition/topics/FFA_interim_recommendations/en/. Acesso em 01 de dezembro de 2011.

67. IWASHYNA, T.J.; WESLEY, E.E.; SMITH, D.M.; LANGA, K.M. Long- term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. **JAMA**, v.304, n. 16, p. 1787-1794, 2010.

68. JACKSON, G.D.F.; DAI, Y.; SEWELL, W.A. Bile mediates intestinal pathology in endotoxemia in Rats. **Infection and Immunity**, v. 68, n.8, p. 4714-4719, agosto 2000.

69. JACONI, M.E.E.; LEW, D.P.; CARPENTIER, J.L.; MAGNUSSON, K.E.; SJOGREN, M.; STENDAHL, O. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome- lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. **The Journal of Cell Biology**, v.110, p. 1555-1564, 1990.

70. JANEWAY, C.A; TRAVERS, M.W.; SHOLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre,: ARTMED, 2002.

71. JAKUBOWSKI, A.; MAKSUMOVICH, N.; LSZANECKI, R.; GEBSKA, A.; GASSER, H.; PODESSER, B.K.; HALLSTROM, S.; CHLOPICKI, S. S-nitroso human serum albumin given after LPS challenge reduces acute lung injury and prolongs survival in a rat model of endotoxemia. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.379, p.281–290, 2009.

72. JEAN- BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.22, p. 63-72. 2007.

73. JENKINSON, A.; FRANKLIN, M.F.; WAHLE, K.; DUTHIE, G.G. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p. 523-528, 1999.

74. JENNER, G.; YOUNG, R.A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 281-294, abril 2005.

75. KHAN, W.A.; BLOBE, G.C.; HANNUN, Y.A. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. **Cellular Signalling**, v.7, n.5, p. 171-184, 1995.

76. KNAPP, H.R.; HULLIN, F.; Jr SALEM, N. Asymmetric incorporation of dietary n-3 fatty acids into membrane aminophospholipids of human erythrocytes. **Journal of Lipid Research**, v.35, p. 1283-1291, 1994.

77. KURLAK, L.; STEPHENSON, T. Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v.80, n. 2, F148- F154, 1999.

78. KRIS- ETHELTON, P.; ECKEL, R.H.; HOWARD, S.S., St. JEOR, S.; BAZARRE, T.L. Lyon Heart Study: Benefits of a Mediterranean-style, National Cardiovascular Disease Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern. **Circulation**, v.103, p.1823- 1825, 2001.

79. LANDSBERGER,M.; ZHOU, J.; WILK, S.; THAUMULLER, C.; AVLOVIC, D.; OTTO, M.; WHYNOT, S.; HUNG, O.; MURPHY, M.F.; CERNY, V.; FELIX, S.B.; LEHMANN, C. Inhibition of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces leukocyte adhesion within the intestinal microcirculation in experimental endotoxemia in rats. **Critical Care**, v.14, R223, 2010.

80. LEHMANN, C.; MEISSNER, K.; KNOCK, A.; DIEDRICH, S.; PAVLOVIC, D. Activated protein C improves intestinal microcirculation in experimental endotoxaemia in the rat. **Critical Care**, v.10, n.6, R157, 2006.

81. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

82. LI, Y.; FERRANTE, A.; POULOS, A.; HARVEY, D.P. Neutrophil oxygen generation. Synergistic responses to tumour necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids. **Journal of Clinical Investigation**, v.97, n.7, p. 1605-1609, 1996.

83. LIM, CM. ; KIM, EK; KOH, Y.; KIM, WS; KIM, DS. Hypothermia inhibits cytokine release of alveolar macrophage and activation of nuclear factor kB in endotoxemic lung. **Intensive Care Medicine**, v.30, p. 1638–1644, 2004.

84. LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação Lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.3, p. 293- 303, 2001.
85. LORNE, E.; ZMIJEWSKI, J.W.; ZHAO, X.; LIU, G.; TSURUTA, Y.; PARK, YJ.; DUPONT, H.; ABRAHAM, E. Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce pro-inflammatory cytokine production. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.294, C985-C993, 2008.
86. LUOSTARINEN, R.; SALDEEN, T. Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.55, n.3, p.167-172, 1996.
87. LI, Y.; FERRANTE, A.; POULOS, A.; HARVEY, D.P. Neutrophil oxygen generation. Synergistic responses to tumour necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids. **Journal of Clinical Investigation**, v.97, n.7, p. 1605-1609, 1996.
88. MACRI, M.M.; FOUTO, J.E.; de SOUZA, C.J.F.; NICOLUZZI, J.E.L.; CARON. P.E.; REPKA, J.C.D. Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró- inflamatórias em modelo experimental de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.22, n.4, p. 206-211, 2009.
89. MADHAVI, N.; DAS, U.N. Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the survival of vincristine human cervical carcinoma cells in vitro. **Cancer Letters**, v. 84, n.1, p. 31-41, 1994.
90. MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M.A.; CONSTATINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptative immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 519-531, agosto 2011.

91. MARTINS, P.S.; KALLAS, E.G.; NETO, M.C.; DALBONI, M.A.; BLECHER, S.; SALOMÃO, R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **Shock**, v.20, n.3, p. 208-212, 2003.

92. MASON, R.J.; STOSSEL, T.P.; VAUGHAN, M. Lipids of alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes and their phagocytic vesicles. **The Journal of Clinical Investigation**, v.51, p. 2399-2407, setembro 1972.

93. MASSARO, M.; HABIB, A.; LUBRANO, L.; DEL TURCO, S.; LAZZERINI, G.; BOURCIER, T.; WEKSIER, B.B.; DeCATERINA, R. The Omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase- 2 induction through NADP (H) oxidase e PKC ϵ inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.41, p. 15184-15189, 2006.

94. McMURCHIE, E. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. **Physiological Regulation of Membrane Fluidity**, p.139-137, 1988.

95. MISHRA, A.; CHAUDHARY, A.; SETHI, S. Oxidized omega- 3 fatty acids inhibit NF κ B activation via a PPAR α dependent pathway. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.24, p. 1621-1627, 2004.

96. MIRNIKJOO, B.; BROWN, S.E.; KIM, H.F.S.; MARAGELL, L.B.; SWEATT, J.D.; WEEBER, E.J. Protein kinase inhibition by ω -3 fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.14, p.10888- 10896, 2001.

97. MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, p. 209-212, fevereiro 2003.

98. MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p. 958-970, 2008.

99. MUKARO, V.R.; CONSTABILE, M.; MURPHY, K.J.; HIL, C.S.; HOWE, P.R.; FERRANTE, A. Leukocyte numbers and function in subjects eating n-3 enriched foods: selective depression of natural killer cell levels. **Arthritis Research & Therapy**, v.10: R57, 2008.
100. MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p. 723-737, novembro 2011.
101. NATHAN, C.F. Neutrophil activation on biological surfaces massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages e lymphocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.80, p. 1550-1560, 1987.
102. 101. OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. Cytokine signaling- regulation of the immune response in normal and critically ill states. **Critical Care Medicine**, v. 28, n.4, suplemento, p. N3-N12, abril 2000.
103. PALOZZA, P.; SGARIATA, E.; LUBERTO, C.; ANTI, M.; MARRA, G.; ARMELAO, F.; FRANCESCHELLI, P.; BARTOLI, G.M. n-3 Fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, p. 297-304, 1996.
104. PECK, G.M.F. **Ativação de macrófagos e sua correlação com o desfecho da sepse**. 62 fl. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007
105. PERL, M.; CHUN- SHIANG, C.; GARBER, M.; XING,H.; AYALA, A. Contribution of anti- inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 272-299, janeiro 2006.
106. PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p.211-226, 1981.

107. PINSKY, M.R.; VINCENT, J.L.; DEVIERE, J.; ALEGRE,M.; KAHN, R.J.; DUPONT, E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. **Chest**, v.103; p. 565- 575, 1993.
108. PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Technology Fish Immunology**, v4, p. 93-100, 1995.
109. PIZATO, N.M.P. **Efeito da dieta com diferentes proporções de ácidos graxos n-6: n-3 sobre o crescimento tumoral, caquexia e sistema imunitário em ratos portadores de tumor de Walker 256**. 80 fl. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
110. PIZATO, N.; BONATTO, S.; PICONCELLI, M.; de SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L.; NALIWAIKO, K.; NUNES, E.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition**, v.22, p.425-432, 2006.
111. POLI-DE-FIGUEIREDO, L.F.; GARRIDO, A.; NAKAGAWA, N.; SANNOMIYA, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v.30, suplemento 1, p. 53-59, 2008.
112. SABROE, I.; PRINCE, L.R.; JONES, E.C.; MALCOLM, J.H.; FOSTER, S.J.; VOGEL, S.N.; DOWER, S.K.; WHYTE, M.K.B. Selective Roles for Toll- like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in the regulation of neutrophil activation and life span. **The Journal of Immunology**, v.170, p. 5268-5275, 2003.
113. SADEGUI, S.; WALLACE, P.C.; CALDER, P. Dietary lipids modify cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. **Immunology**, v.96, p.404-410, 1999.

114. SALES JÚNIOR, J.A.L.; DAVID, C.M.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINEIRO, C.T.S; FRIEDMAN,G.; da SILVA, O.B.; DIAS, M.D.; KOTERBA, E.; DIAS, F.S.; PIRAS, C.; Grupo de Estudo do Fundo AMIB; LUIZ, R.R. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n.1, p. 9-17. 2006.

115. SCHOENFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, p.231-241, 2008.

116. SCHROIT, A.J.; GALLILY, R. Macrophage fatty acid composition and phagocytosis: Effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. **Israel Immunology**, v.36, p.199-205, 1979.

117. SCHUMANN, R.R.; LEONG, S.R., FLAGGS, G.W.; GRAY, P.W.; WRIGHT, S.D.; MATHINSON, J.C.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science**, v. 249, p. 1429-1431, 1990.

118. SIERRA, S.; LARA- VILLOS, F.; COMALADA, M.; OLIVARES, M.; XAUS, J. Dietary fish oil n-3 fatty acids increase regulatory cytokine production and exert anti- inflammatory effects in two murine models of inflammation. **Lipids**, v.41, p. 1115- 1125, 2006.

119. SILVA, E. ; de ALMEIDA PEDRO, M.; SOGAYAR, A.C.B.; MOHOVIC, T.; de OLIVEIRA SILVA, C.L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R.G.R.; de SOUSA, E.F.; ABE, T.P.; de ANDRADE, J., de MATOS, J.D.; REZENDE,E.; ASSUNÇÃO,M.; AVEZUM,A.; ROCHA, P.C.S.; de MATOS G.F.J.; BENTO, A.M.; CORRÊA, A.D.; VIEIRA, P.C.B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**. 8 :R251-R260. 2004.

120. SILVA, E. ; OTHERO, J.B. I Consenso Brasileiro de Sepsis. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.16, n.2, p. 102-104, 2004.

121. SIMOPOULOS, A.P. Evolucionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n.5 & 6, p. 421-429, 1999a.

122. SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70 (suplemento), p.560s-569s, 1999b.

123. SINGER, P.; SHAPIRO, H.; THEILLA, M.; ANBAR, R.; SINGER, J.; COHEN, J. Anti- inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and integrative perspectives. **Intensive Care Medicine**, v. 34, p. 1580- 1592, 2008.

124. SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p. 427-439, junho 2010.

125. STEARNS- KUROSAWA, D.J.; OSUCHOWSKI, M.F.; VALENTINE, C.; KUROSAWA, S.; REMICK, D.G. The pathogenesis of sepsis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of disease**, v.6, p. 19-48, 2011.

126. STULNIG, T.M.; HUBER, J.; LEITINGER, N.; IMRE, EM.; ANGELISOVÁ, P.; NOWOTNY, P.; WALDHAUSL, W. Polyunsaturated eisosapentaenoic acid displaces proteins from membrane lipid rafts by altering raft lipid composition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.40, p. 37335-37340, 2001.

127. TAVARES, E.; MINANO, F.J. Immunoneutralization of the aminoprocaltitonin peptide of procalcitonin protects rats from lethal endotoxaemia: neuroendocrine and systemic studies. **Clinical Science**, v.119, p. 519-534, 2010.

128. THIES, F.; MILES, E.A.; NEBE- von- CARONC, N.; POWELL, J.R.; HURST, T.L.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Influence of dietary supplementation with long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. **Lipids**, v.36, p. 1183-1193, novembro 2001.

129. TOBIAS, P.S.; SOLDAU, K; IOVINE, N.M.; ELSBACH,P.; WEISS,J. Lipopolysaccharide (LPS)- binding proteins BPI e LBP form different types of complexes with LPS. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18682-18685, julho 1997.

130. TULL, S.P.; YATES, C.M.; MASKREY, B.H.; O`DONNEL, V.B.; MADDEN, J. Omega- 3 fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLos Biology**, v. 7, n.8, p.1-11, 2009.

131. URSIN, V.M. Modification of plant lipids for human health: development of functional land- based omega- 3 fatty acids. **Journal of Nutrition**, v.133, n.12, p. 4271- 4274, 2003.

132. van der POLL, T.; van DEVENTER, S.J.H. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 13, n.2, p. 413- 426, junho 1999.

133. VEDIN, I.; CEDERHOLM, T.; LEVI, Y.F.; BASUN, H.; GARLIND, A.; IRVING, G.F.; JONHAGEN, M.E.; VESSBY, B.; WAHLUND, LO.; PALMBLAD, J. Effects of docosahexaenoic acid- rich c-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 1616- 1622, 2008.

134. VÍCTOR, V.M.; MIÑANO, M.; GUAYERBAS, N.; DEL RIO, M.; MEDINA, S.; De La FUENTE, M. Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophages. **Molecular and Cellular Biology**, v. 189, p. 25- 31, 1998.

135. VÍCTOR, V.M.; DE LA FUENTE, M. Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin- induced oxidative stress. **Physiol. Res.**, v. 52, p. 101- 110, 2003.

136. VÍCTOR, V.M.; ROCHA, M.; DE La FUENTE. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **International Immunopharmacology**, v.4, p. 327-347, 2004.

137. VINCENT, J.L.; YASSER S.; SPRUNG,C.L.; RANIERI,M.; REINHART,K.; GERLACH, H.; MORENO,R.; CARLET, J.; LE GALL, J; PAYEN,D. Sepsis in European Intensive Care Units: Results of the SOAP Study. **Critical Care Medicine**, v.34, n.2, p. 344- 353. 2006.

138. VINCENT, J.L.; RELLO, J.; MARSHALL,J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C.D.; MORENO,R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL,C.; REINHART,K. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 344- 353, 2009.

139.VIRELLA, G.; KILPATRICK, J.M.; RUGELES, M.T.; HYMAN, B.; RUSSEL, R. Depression of humoral responses and phagocytic functions *in vivo* and *in vitro* by fish oil and eicosapentanoic acid. **Clinical Immunology and immunopathology**, v.52, n.2, p. 257-270, 1989.

140. VOLMAN, T.J.H.; HENDRIKS, T.; GORIS, J.A. Zymosan- induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. **Shock**, v. 23, n.4, p. 291- 297, 2005.

141. YEUNG, T.; OZDAMAR, B.; PAROUTIS, P.; GRINSTEIN, S. Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.18, p. 429- 437, 2006.

142. WEATHERILL, A.R.; LEE, J.Y.; ZHAO, L.; LEMAY, D.G.; YOUN, H.S.; HWANG, D.H. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. **The Journal of Immunology**, v.174, p. 5390-5397, 2005.

143. WESCHE, D.E.; LOMAS-NEIRA, J.L.; PERI, M.; CHUNG, CS.; AYALA, A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 325-337, agosto 2005.

144. WITTHAUT, R.; FARHOOD, A.; SMITH, C.W.; JAESCHKE, H. Complement and tumor necrosis factor contribute to Mac- 1 (CD11b/CD18) up- regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. **Journal of Leukocyte Biology**, v.55, p.105-111, 1994.

145. WONG, S.W.; KWON, MJ; CHOI, A.M.K; KIM, HP.; NAKAHIRA, K.; HWANG, D.H. Fatty acids modulate Toll- like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into Lipid Rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.40, p.27384-27392, 2009.

146. WRIGHT, S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J.; MATHINSON, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p. 1431- 1433, 1990.